



Stratégie de vectorisation d'acides nucléiques et de drogues anticancéreuses dans les cellules hépatiques en culture

Véronique Laurent

► To cite this version:

Véronique Laurent. Stratégie de vectorisation d'acides nucléiques et de drogues anticancéreuses dans les cellules hépatiques en culture. Biologie cellulaire. Université Rennes 1, 2010. Français. NNT : . tel-00518984

HAL Id: tel-00518984

<https://theses.hal.science/tel-00518984>

Submitted on 17 Sep 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne
pour le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Véronique LAURENT

préparée à l'unité de recherche INSERM UMR 991

Foie, Métabolismes et Cancer

Université de Rennes 1, Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Stratégie de
vectorisation
d'acides nucléiques
et de drogues
anticancéreuses
dans les cellules
hépatiques
en culture**

**Thèse soutenue à Rennes
le 7 juillet 2010**

devant le jury composé de :

Claude FEREC

Professeur PU-PH - Université de Bretagne Occidentale
INSERM U613, Brest

Président

Isabelle de WAZIERS

Chargée de Recherche - INSERM U775, Paris

Rapporteur

Nicolas FERRY

Directeur de Recherche - INSERM U948, Nantes

Rapporteur

Paul-Alain JAFFRES

Professeur - Université de Bretagne Occidentale, Brest

Examineur

Thierry BENVEGNI

Professeur - Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

Examineur

David GILOT

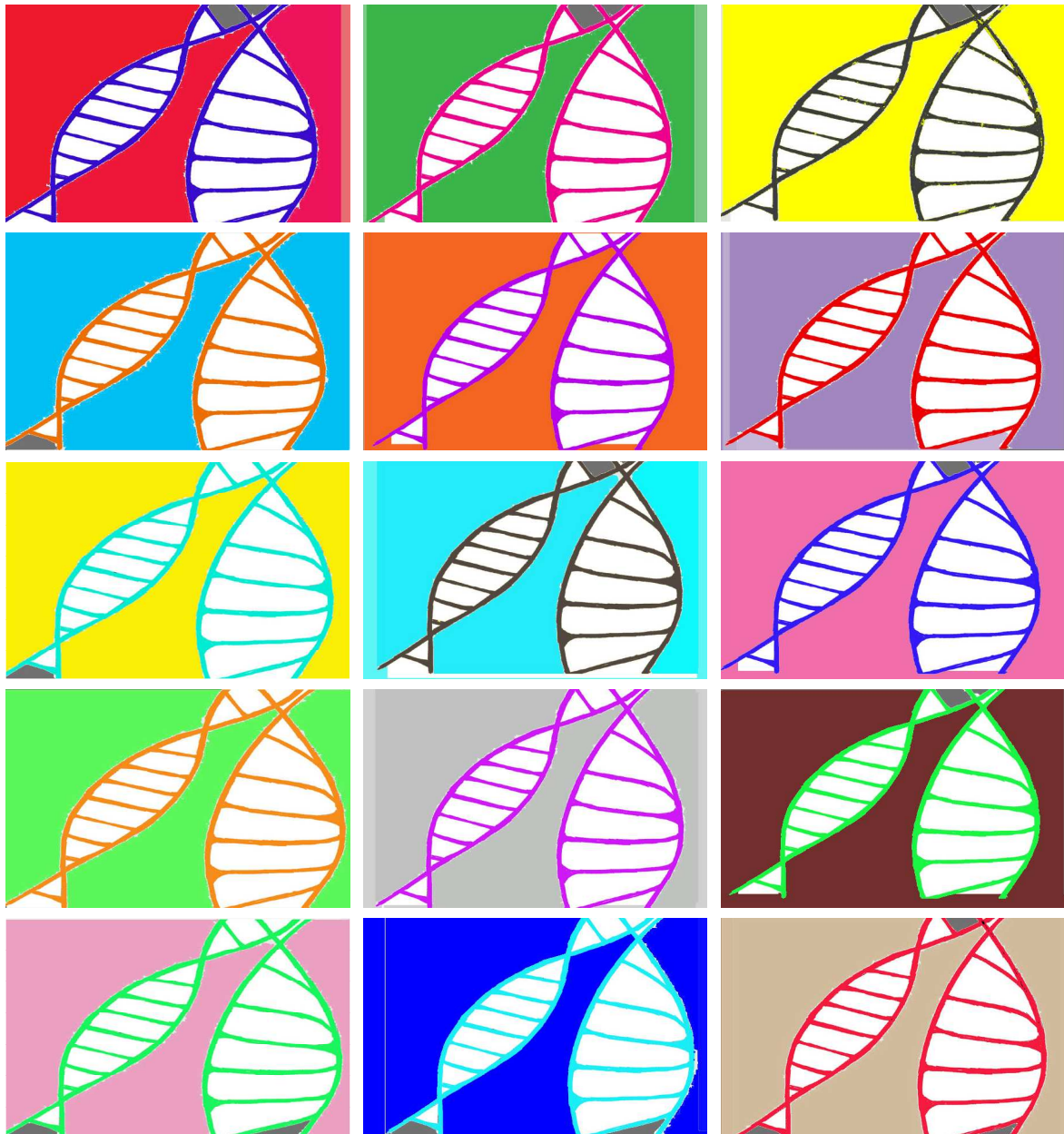
Maître de Conférences - Université de Rennes 1

Examineur

Pascal LOYER

Chargé de Recherche - INSERM UMR 991, Rennes

Directeur de thèse



« La recherche comporte et comportera toujours
une part importante d'activité créatrice »
Pierre Joliot

Stratégie de vectorisation d'acides nucléiques et de drogues anticancéreuses dans les cellules hépatiques en culture

Les cellules de la lignée d'hépatome HepaRG sont des progéniteurs bipotents capables de se différencier à confluence en cellules biliaires et en hépatocytes exprimant un large éventail de fonctions spécifiques du foie notamment plusieurs enzymes clés de détoxification. Ce système cellulaire constitue un modèle unique pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régissant le processus de différenciation du progéniteur hépatique vers l'hépatocyte ou encore certains aspects de régulation du cycle cellulaire de l'hépatocyte. Par ailleurs, il offre un modèle cellulaire alternatif aux cultures primaires d'hépatocytes humains pour des applications en pharmacotoxicologie. Cependant, ces cellules expriment un niveau relativement limité d'un important cytochrome P450, le CYP2E1, restreignant leur utilisation pour les études de toxicologie des drogues métabolisées par cette voie. Nous avons comme objectif d'établir des protocoles efficaces de transfection afin d'augmenter l'expression du CYP2E1 dans les cellules HepaRG. Des protocoles de transfection efficaces ont été établis en utilisant l'électroporation et des lipides cationiques appartenant aux lipophosphonates et lipophosphoramidates. Ces approches nous ont permis d'augmenter significativement le niveau d'expression et d'activité du CYP2E1 dans les cellules HepaRG différenciées ouvrant de nouvelles perspectives pour des études de métabolisme et de toxicité des drogues dépendantes du CYP2E1. La mise au point de ces protocoles de transfection a été mise à profit pour aborder d'autres applications notamment la répression par siARN de l'expression du récepteur aux amines aromatiques hétérocycliques AhR. Nous avons pu par électroporation dans des cellules HepaRG différenciées démontrer que AhR est au moins en partie responsable de l'induction des CYP1A1 et 1A2 par les amines aromatiques hétérocycliques PhIP et MeIQx. Toujours en utilisant un protocole d'électroporation, nous avons également établi une lignée HepaRG recombinante exprimant de façon constitutive l'hepcidine en fusion avec la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette lignée constitue un nouvel outil d'étude du processus de maturation et de sécrétion de l'hepcidine un régulateur hormonal central du métabolisme du fer. Enfin, dans une dernière partie du travail, nous avons abordé un nouveau type de vectorisation : des nanoparticules synthétisées à partir de poly-acide malique dans le but d'encapsuler des principes actifs anticancéreux pour des applications potentielles dans le ciblage du carcinome hépatocellulaire. Une première étape a consisté à étudier la toxicité in vitro de ces particules sur plusieurs lignées cellulaires puis d'évaluer leur potentiel d'encapsulation de principe actif en utilisant la doxorubicine comme molécule de référence.

Mots-clés : Cellules HepaRG, vectorisation, transfection, électroporation, lipides cationiques, nanoparticules, CYP2E1, AhR, hepcidine.

HepaRG hepatoma cells are bipotent progenitors capable of differentiating after reaching confluence into biliary and hepatocyte-like cells expressing a large set of liver-specific functions including key drug metabolism enzymes. This new cell system is a unique in vitro model to investigate molecular and cellular pathways involved in the process of differentiation from hepatic progenitors towards hepatocytes as well as various aspects of the hepatocyte cell cycle regulation. In addition, it provides an alternative to primary culture of normal human hepatocytes for applications in the field of toxicology and drug metabolism. These cells, however, only express small amounts of an important cytochrome P450, the CYP2E1, which limits their use for toxicological studies of drugs metabolized by this pathway. Our aim was to establish efficient transfection protocols to increase CYP2E1 expression in HepaRG cells. Efficient transfection protocols were established using electroporation and cationic lipids belonging to the lipophosphonate and lipophosphoramidate family compounds. These protocols allowed us to achieve transient enforced expression of active CYP2E1 in differentiated HepaRG cells opening new perspectives for drug metabolism and toxicity studies in CYP2E1 expressing HepaRG cells. Efficient transfection protocols were further used to study gene repression by transfecting siRNAs including for the down-regulation of the AhR transcription factor. We demonstrated that the AhR protein is at least in part responsible of the induction of the CYP1A1 and 1A2 following exposure to the heterocyclic aromatic amines PhIP and MeIQx. Then, using optimal electroporation conditions, we derived a new stable recombinant HepaRG cell line expressing high levels of a hepcidine-GFP fusion protein, which constitute a novel cell model to investigate the metabolic pathways involved in the maturation and secretion of the hepcidine protein, a key hormonal regulator of iron metabolism. Finally, we initiated a new study to evaluate the relevance of novel nanoparticles synthesized using poly-malic acid for carrying anticancer drugs to target hepatocellular carcinomas. In a first step, we have studied the in vitro toxicity of these nanovectors using several cell lines then we evaluated the level of encapsulation of the doxorubicin as a standard molecule.

Keywords : HepaRG cells, vectorization, transfection, electroporation, cationic lipids, nanoparticles, CYP2E1, AhR, hepcidine.

Remerciements

Tout d'abord, j'adresse ma profonde reconnaissance au Docteur **Pascal Loyer**, mon Directeur de thèse, qui m'a encadrée au long de cette thèse. Je le remercie de m'avoir accordé son temps et sa confiance et de m'avoir fait bénéficier de son dynamisme, de son efficacité et de ses idées novatrices. J'ai pu bénéficier de sa grande connaissance de l'hépatocyte, et du carcinome hépatocellulaire, de la vectorisation et de son recul vis à vis de la recherche qui, si elle est sérieuse, ne doit pas pour autant être menée dans la morosité. J'ajoute donc la bonne humeur aux nombreuses leçons tirées de ces mois passés ensemble. Je le remercie pour la qualité de son encadrement, tout en suscitant ma prise d'initiatives. Son écoute et sa disponibilité ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie ensuite le Docteur **Anne Corlu**, pour son soutien et nos échanges, ainsi que le Docteur **Fabrice Morel**, pour avoir encouragé mes recherches.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Christiane Guguen-Guillouzo**, Directrice de l'Unité INSERM U522 « Régulations des équilibres fonctionnels du foie normal et pathologique » pour son accueil, et pour nos discussions scientifiques. Passionnée et passionnante, elle a su me communiquer son enthousiasme et son goût d'entreprendre. Merci à **Bruno Clément**, qui prend le relais en qualité de Directeur de l'Unité, récemment recréée en U991.

Ces trois années au sein de l'unité INSERM U991 (ex-U522) ont été financées par les quatre comités bretons de la **Ligue contre le Cancer** à qui j'exprime ma gratitude et plus particulièrement à **Monsieur Bourdet**, Président du comité des Côtes d'Armor, qui en a été l'initiateur et coordonnateur ainsi qu'à **Madame Barrois**, organisatrice du Rallye Forestier de l'Espoir de Loudéac et les bénévoles de l'**ESSM** qui l'entourent, sans oublier le concours de l'Université de Rennes1.

Je souhaite remercier le Professeur **Denis Michel** et le Docteur **Pascale Le Goff** (CNRS UMR 6026) avec qui j'ai démarré ma thèse pendant une année sur un sujet proche portant également sur la vectorisation, thèse interrompue en raison de travaux de mise aux normes du laboratoire. Merci au Docteur **Fabienne Desmots** de m'avoir permis de poursuivre sur ce thème, au sein de l'INSERM U991.

Au-delà de leurs compétences, je les remercie ainsi que toute l'équipe pour leur rigueur scientifique, leur recherche de l'innovation, leur soutien, auxquels s'ajoutent de nombreuses qualités humaines que j'ai pu découvrir au travers de cette première année de thèse.

Cette année au sein de l'équipe « Hip » n'aurait pu être réalisée sans le soutien de l'**Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaëtan Saleün** et je remercie chaleureusement son président, **René Vigouroux**.

Ce travail n'aurait pu se concrétiser sans une critique rigoureuse de son contenu, c'est donc sincèrement que je remercie les membres de mon jury de thèse : les Docteurs **Isabelle de Waziers** et **Nicolas Ferry**, Chargée et Directeur de recherche, qui ont accepté d'être rapporteurs. Merci à eux pour la pertinence de leurs commentaires. Je remercie le Professeur **Claude Férec** d'avoir accepté de présider le jury de thèse, les Professeurs **Paul-Alain Jaffrès** et **Thierry Benvegna** ainsi que le Docteur **David Gilot** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux et qui me font l'honneur de leur présence au sein de mon jury de thèse.

Un grand merci à mon tuteur de thèse, le Professeur **Daniel Boujard** et aux membres des comités de thèse qui ont jalonné les travaux. Leurs critiques et suggestions m'ont permis d'orienter et de confirmer les orientations scientifiques retenues pendant la thèse.

Dans mon jury, j'aurais souhaité également la présence des personnes qui ont accepté d'apporter leurs compétences aux travaux de cette thèse, à commencer par tous les membres de la Plate-forme d'exploration fonctionnelle de Biogenouest®, Production de vecteurs de synthèse **SynNanoVect** (IBISA) : le Docteur **Tristan Montier**, le Professeur **Pierre Lehn** (INSERM U613, CHU Brest) et le Docteur **Sandrine Cammas-Marion** (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, UMR CNRS 6226).

J'ai pu bénéficier de l'aide constante des chimistes sans qui ce travail situé à l'interface avec la biologie cellulaire et moléculaire n'aurait pu prendre corps. A ce titre, je voudrais adresser un immense merci aux équipes brestoise et rennaise pour leur implication et leurs

innombrables synthèses, formulations et mesures physico-chimiques de nombreux liposomes, de polymères, ou encore de nanoparticules réalisées en un temps record. Je suis très reconnaissante au Professeur **Paul-Alain Jaffrès** et **Aurore Fraix** (UMR CNRS 6521 - UBO) ainsi qu'à **Thierry Benvegno**, **Sandrine Cammas-Marion**, **Loïc Lemiègre** (UMR CNRS 6226 - ENSCR) pour leur efficacité et nos discussions qui m'ont été d'une grande aide. Merci aussi à **Zhiwei Huang** dit **Marc**, **Julie Barbeau**, **Cécile Neveu** et à **Christophe Lorilleux** pour leur accueil. Au-delà de nos jargons respectifs, notre collaboration a été fructueuse après quelques efforts de traduction.

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans la collaboration de la Plate-forme d'exploration fonctionnelle de Biogenouest®, Imagerie - Puces à Cellules **IMPACcell**, dirigée par **Christiane Guguen-Guillouzo** les Plateformes de Cytométrie de l'IFR140 en la personne de **Gersende Lacombe** ainsi que celle du Groupe "Signalisation et cibles géniques" de l'unité SeRAIC EA 4427, notamment, **Valérie Lecureur**, **David Gilot** et **Eric Le Ferrec**. Merci à **Karine Labour** de nous avoir initialement présenté le microporateur et à **C. Chesné** et **G. Ribault** de **Bioprédic** pour les mesures d'HPLC. Merci au Professeur **Laurent Meijer** (Station Biologique de Roscoff, CNRS) de nous avoir permis de tester des molécules marines d'intérêt contre le cancer.

La recherche est un travail d'équipe pour lequel les résultats sont obtenus grâce aux compétences de chacun mais aussi grâce à des rencontres et aux nombreuses collaborations, notamment au sein des unités **INSERM** de Rennes, l'**IFR140**, de l'**Université de Rennes1** et du **CHU** de Rennes. Je souhaite remercier toutes les personnes de l'unité **INSERM U991**, d'hier et d'aujourd'hui, que j'ai côtoyées avec beaucoup de plaisir pendant trois années, à commencer par la première personne présente chaque matin, **Patricia Jouas**. Je garderai le souvenir de votre bienveillance, de votre sympathie, de vos encouragements et de m'avoir toujours épaulée à la paillasse et accompagnée dans les pauses café. J'ai une immense pensée pour l'équipe **Stress, Défenses et Régénération** : **Catherine, Denise, Adeline, Claudine, Kélig, Rémy, les deux Caroline, Sandeep, Ismail, Julie, Marie-Hélène, Claire, Ghizlane et Ghislaine** ainsi que les nouveaux venus, **Hélène, Myriam, les deux Vincent, Yann, Anne-Sophie**. Vous m'avez tant appris sur les plans scientifique et humain, aussi bien en culture cellulaire qu'en culture très générale...

Merci pour l'accueil chaleureux que l'ensemble du laboratoire m'a réservé, je n'oublierai pas l'ambiance de travail et de convivialité alliant discussions scientifiques et parenthèses variées, pour constituer une expérience humaine exceptionnelle. Je vous témoigne toute mon amitié et mon estime. Pour évoquer les travaux de cette thèse, je suis ravie que les mises au point de protocoles que vous m'avez aidée à réaliser vous servent aujourd'hui en vous permettant de gagner du temps, et d'avoir contribué à vous apporter un petit plus dans votre quotidien.

Les applications développées avec **Pascal Loyer** ont permis de mettre en œuvre des collaborations avec **Isabelle de Waziers, Catherine Ribault, Claudine Rauch** et **Caroline Aninat** sur l'expression du cytochrome CYP2E1, **Julie Dumont, Rozenn Jossé, Carine Lambert, Sébastien Anthérieu** et **André Guillouzo** sur la répression de l'expression du récepteur AhR, **Lénaïck Détivaud** et **Olivier Loréal** sur la production de la protéine hepcidine, ainsi que **Sandrine Cammas-Marion, Zhiwei Huang, Valentine Genet, Ghizlane Chetouani, Kathleen, Laurent Meijer, Christiane Guguen-Guillouzo, Rémy Le Guével, Denise Glaise, Catherine Ribault, Ismaïl Ben Mosbah, Julie Pajaud** sur l'évaluation des nanomédicaments.

A celles et ceux avec qui j'ai partagé mon bureau, **Tuoi, Nicolas** puis **Kélig, Lénaïck** et **Claudine** pour nos échanges sur la science et sur la vie, notre quotidien pimenté et tous nos moments passés ensemble toujours teintés d'humour et de complicité.

Cette formation par et pour la recherche, qu'est le doctorat, m'a permis également de co-encadrer **Marine** et **Valentine**, étudiantes en Master 1, qui ont contribué aux expériences.

Je remercie tous ceux qui m'ont fait découvrir et m'ont donné le goût de la recherche au cours des stages :

L'équipe Développement Précoce de l'unité CNRS UMR 6061 Génétique et Développement, dirigée à l'époque par **Michel Philippe, René Le Guellec, Cathy Le Goff** ainsi que **Xavier, Anne, Jean-Pierre, Isabelle, Stéphanie** et **Caroline** pour m'avoir fait découvrir toutes les possibilités qu'offre l'hybridation *in situ* sur les œufs de xénopes.

L'équipe Rétrovirus et Transfert Génétique de l'Institut Pasteur - Paris et en particulier **Jean-Michel Heard, Béatrice Durand et Nathalie** pour m'avoir tant appris en recherche et dans bien d'autres domaines.

L'équipe du Laboratoire d'Intelligence Artificielle et de Sciences Cognitives de Sup Télécom Brest en partenariat avec Ifremer avec une pensée pour **Philippe Picouet**, qui m'a fait découvrir les joies de la bio-informatique et de ses langages.

L'ensemble de l'équipe de l'unité INSERM U613, mon premier stage de recherche, pour m'avoir transmis le virus, en l'occurrence de la vectorisation même non virale ! Merci au Professeur **Claude Férec**, au Docteur **Tristan Montier**, que j'ai eu le plaisir de retrouver dans le cadre de nos collaborations pour la thèse et merci aussi aux Docteurs **Pascal Delépine** et **Christine Guillaume-Gable**. Une pensée pour le Professeur **Marc Blondel, son équipe** et toute particulièrement pour le Docteur **Cécile Voisset**, merci de m'avoir suivie au fil de toutes ces années et pour nos retrouvailles régulières ! Merci aux Docteurs **Catherine** et **Laurent Corcos** pour leur soutien.

J'exprime aussi mes remerciements à tous ceux qui m'ont soutenue dans cette longue étape du cursus universitaire :

A ceux que je ne saurais oublier **Pierre, Hervé, Thibaud, Léna, Estelle, Lara, Anne** pour la richesse de nos partages, la dose quotidienne d'humour et nos paris stupides. **K. Boudarène** et **N. Hingant** pour leurs conseils avisés.

A mes amis fidèles de Rennes, Brest, Paris et d'ailleurs pour les moments de détente et les week-end : **Marie, Cathy, Marina, Cath, Cécile** et **Jean, Maïwenn, Marielle, Florence, Nolwenn** et **Pierre, Sandrine, Murièle** et **Yohann, Lauriane** et **Mathieu, Anne, Séverine** et **Pierre-Yves, Maïana, Jérôme et Cynthia, Arnaud, Olivier, Dominique et Virginie, Erwan, Emmanuelle, Séverine** et **Yann, Guillaume, Haude, Mathilde, Marie-Christine...**

Je n'oublierai pas mes complices du festival Sciences en Cour[t]s avec qui nous avons porté et organisé cette manifestation de vulgarisation scientifique auprès des lycées et du grand public depuis 2007. Cette expérience riche en contacts et en échanges humains m'a offert la possibilité de découvrir le volet de la communication scientifique en rencontrant des doctorants formidables doués d'une créativité communicative : **Emeric, Vincent, Thomas, Xavier, Anthony, Aurélien, Sasse, Luc, Nadia, Béa, Pauline, Maud, Marie-Laure, Eugénie, Pierre, Julien, et les nouveaux : Chloé, Marine, Hélène, Benjamin, Didier, Aymeric, Marion et Francine**. Ce fut l'occasion d'aller à la rencontre de professionnels de la recherche, de sa valorisation, sa vulgarisation, mais aussi des médias et de professionnels de l'audiovisuel. Merci à **Pascal** de m'avoir laissé le temps de m'y investir parfois sur les heures du labo mais toujours dans l'optique de valoriser la recherche et d'attirer les plus jeunes vers le doctorat !

Merci à ceux qui m'ont aidée à réaliser mon très court-métrage sur mes travaux de thèse : **Pierre, Bruno, Adeline, Fabienne, Gaëlle, Léna, Catherine Le Guen, Catherine Le Quintrec, Annabelle, Isabelle, Benoît, sans oublier Estelle, Allan et leur petite Lena**.

Aux nombreux doctorants rencontrés depuis le Master, dans les formations de l'Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé, du Collège des Ecoles Doctorales, ou les associations de doctorants Nicomaque, LUCA et DocAir, devenus des amis.

A ma famille au sens large, petits et grands, à mes deux grands-mères pour lesquelles j'ai une pensée.

A mes **parents** d'exception pour lesquels les mots vont vite me manquer... Merci pour leur optimisme, leur gaieté, leur énergie, leur détermination, leur générosité et leur soutien inconditionnels ainsi que pour leur disponibilité indéfectible.

A mes **sœur** et **frère** et leurs conjoints qui répondent toujours présents, et qui ont cru en moi, pour leur inventivité, et leur humour.

Merci aux amis de mes amis, aux amis de mes parents et de mes sœur et frère pour leurs maintes attentions.

Merci aux relecteurs et relectrices qui ont consacré du temps à relire cette thèse, ainsi qu'à la retoucheuse de tous les instants qui se reconnaîtra. Merci à la graphiste et à son complice pour leur créativité et leur fidélité sans faille.

Mille excuses à tous ceux que j'aurais oubliés, la thèse est avant tout une aventure collective pour laquelle vous m'avez encouragée en me soutenant de près ou de loin et je vous dis Merci.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS

ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION	1
Chapitre 1. Le foie	2
I. Généralités sur le foie	3
II. Le carcinome hépatocellulaire	33
Chapitre 2. Les modèles in vitro	58
I. Introduction	59
II. Cultures primaires d'hépatocytes	61
III. Lignées d'hépatomes	62
IV. La lignée HepaRG	63
Chapitre 3. Vectorisation non virale : Méthodes et applications	67
I. Revue des méthodes de vectorisation	68
II. Applications du transfert de gènes in vitro	106
III. Applications du transfert de gènes in vivo	108
CADRE ET BUTS DU TRAVAIL	125
RESULTATS	128
Résultats 1. Transfert de gènes dans les cellules HepaRG	129
Partie A (Article 1). Application à la surexpression du cytochrome P4502E1	130
Partie B (Article 2). Répression de l'expression du récepteur aux amines aromatiques hétérocycliques (AhR) dans les cellules HepaRG différenciées	153
Résultats 2. Production d'une protéine recombinante sécrétée, l'hepcidine	158
Résultats 3. Encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules	167
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	178
BIBLIOGRAPHIE	185
ANNEXES	212

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS

ABRÉVIATIONS

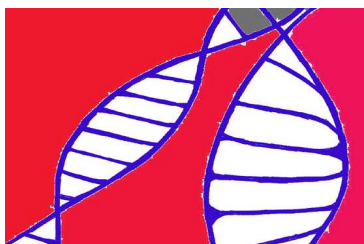
LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION	1
Chapitre 1. Le foie	2
I. Généralités sur le foie	3
1. Anatomie	3
2. Architecture	5
a. Segmentation	5
b. Structure microscopique	6
3. Vascularisation, drainage lymphatique, innervation	8
4. Les cellules hépatiques	10
a. Les cellules non parenchymateuses	10
b. Les hépatocytes	11
5. Les fonctions hépatiques	13
6. La régénération hépatique	20
a. Equilibre de la masse hépatique	20
b. Efficacité de la régénération hépatique	22
c. Les mécanismes de la régénération hépatique	22
d. Régulation particulière du cycle cellulaire	31
II. Le Carcinome Hépatocellulaire	33
1. Les cancers	33
2. Les pathologies du foie	33
3. Bases générales de la cancérogenèse	34
4. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)	36
a. Historique du CHC	36
b. Epidémiologie du CHC	37
c. Mécanismes de l'hépatocarcinogenèse	37
d. Les altérations génétiques et moléculaires dans les CHC	39
e. Le rôle des cellules souches dans le développement des cancers	43
5. Causes	44
6. Diagnostic	45
a. Manifestations cliniques	46
b. Examens paracliniques	46
c. Marqueurs pronostiques	48
7. Traitements	51
a. Traitement des cancers	51
b. Traitement du CHC	52
c. Le traitement chirurgical	53
d. Le traitement médical	54

Chapitre 2. Les modèles in vitro	58
I. Introduction	59
II. Cultures primaires d'hépatocytes	61
1. Biopsies chirurgicales et perfusion de foie pour l'isolement des hépatocytes	61
2. Culture pure	61
3. Co-culture	62
III. Lignées d'hépatomes	62
1. Lignées d'hépatomes obtenues à partir de biopsies de CHC	62
2. Lignées d'hépatomes humains immortalisées artificiellement	63
IV. La lignée HepaRG	63
1. Description	63
2. Culture des cellules HepaRG	65
3. Protocole du décollement sélectif	66
Chapitre 3. Vectorisation non virale : Méthodes et applications	67
I. Revue des méthodes de vectorisation	68
1. Généralités	68
2. Les vecteurs viraux	71
3. Méthodes physiques	72
a. L'ADN nu	73
b. Le pistolet à gènes ou biolistique	73
c. L'injection sans aiguille	73
d. Les ultrasons	73
e. Le laser	74
f. L'occlusion du flux sanguin	74
g. L'électrotransfert ou électroporation	74
h. La magnétofection	75
i. L'injection hydrodynamique ou à haute pression	76
j. Le massage	76
4. Vecteurs synthétiques	77
a. Généralités sur les vecteurs synthétiques	77
b. Vectorisation par liposomes	80
c. Vectorisation par polymères	96
d. Nanovecteurs	99
e. Peptides	104
II. Applications du transfert de gènes in vitro	106
III. Applications du transfert de gènes in vivo	108
1. Thérapie génique	109
a. Les essais cliniques	110
b. Le choix de la stratégie : ex vivo ou in vivo	112
c. Le choix du gène	112
d. Le choix du vecteur	113
2. Thérapie génique du cancer	114
a. Essais cliniques de thérapie génique du cancer	114
b. Le choix du gène en thérapie génique du cancer	114
c. Choix du vecteur en thérapie génique du cancer	120
d. Applications des vecteurs synthétiques au cancer	120
3. Thérapie génique du Carcinome Hépato-Cellulaire	122
4. Conclusion sur la thérapie génique	124

CADRE ET BUTS DU TRAVAIL	125
RESULTATS	128
Résultats 1. Transfert de gènes dans les cellules HepaRG	129
Partie A (Article 1). Application à la surexpression du cytochrome P4502E1	130
I. Introduction	131
II. Résultats	131
1. Transfection par les réactifs commerciaux	131
2. Transfection par des lipides cationiques	133
3. Transfection par microporation	142
4. Relation efficacité versus quantité d'ADN	144
5. Relation efficacité de transfection versus quantité de plasmide intracellulaire	145
6. Surexpression du CYP2E1 dans les cellules HepaRG	146
III. Discussion et perspectives	150
Partie B (Article 2). Répression de l'expression du récepteur aux amines aromatiques hétérocycliques (AhR) dans les cellules HepaRG différenciées	153
I. Introduction	154
II. Résultats	154
1. Contexte général de l'étude	154
2. Electroporation de siARN	154
3. Le récepteur AhR	155
4. Transfection des siRNA ciblant le récepteur Ah	155
5. Transfection des vecteurs d'expression	156
Résultats 2. Production d'une protéine recombinante sécrétée, l'hepcidine	158
I. Introduction	159
II. Résultats	160
III. Discussion et perspectives	164

Résultats 3. Encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules	167
I. Introduction	168
II. Approches techniques	168
III. Résultats	170
1. Paramètres physico-chimiques des nanoparticules	170
2. Encapsulation de la doxorubicine	171
3. Tests toxicologiques des nanoparticules vides	172
4. Tests toxicologiques des nanoparticules PMLA encapsulant la doxorubicine versus doxorubicine libre	173
5. Biodistribution in vivo	174
6. Recherche de nouvelles molécules d'intérêt	175
a. Tests toxicologiques des inhibiteurs de protéines kinases libres	175
b. Tests toxicologiques des inhibiteurs de protéines kinases encapsulés	176
IV. Discussion et perspectives	177
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	178
I. Vectorisation non virale des cellules HepaRG	179
II. Applications	181
1. Surexpression du CYP2E1	181
2. AhR	182
3. Hepcidine	182
III. Nanoparticules et principes actifs	182
IV. Perspectives générales	183
1. Modèles de culture : 3D	183
2. Molécules anti-cancéreuses	184
BIBLIOGRAPHIE	185
ANNEXES	212
Annexe 1. Interactions CYP et xénobiotiques	213
Annexe 2. Classification des CHC	216
Annexe 3. Glossaire de la transgénèse	223
Annexe 4. Vecteurs viraux	225
Annexe 5. Microporator	227
Annexe 6. Essais de thérapie génique sur le cancer	229
Annexe 7. Article 1	232
Annexe 8. Carte des plasmides	233
Annexe 9. Article 2	235
Annexe 10. Transfection des cellules HepaRG	236
Annexe 11. Formulations des liposomes (MM18, KLN47 et BSV10-DOPE)	239
Annexe 12. Chronologie du développement des nanotechnologies	247
Annexe 13. Prix Nobel (médecine, chimie et physique)	251
Annexe 14. 100 ans de progrès depuis le concept de Paul Ehrlich	259



AVANT-PROPOS

« Rien n'est établi », anagramme d' « Albert Einstein »

La science considère que le fait d'avancer sur une hypothèse sans *a priori* est une valeur noble et comme nous le verrons au cours des résultats de la thèse, rien n'était écrit.

Nous avons souvent été surpris de voir nos *a priori* battus en brèche. C'est bien la richesse de la recherche que de pouvoir bouleverser nos préjugés et reconsidérer les données avec un regard nouveau. Nous avons réalisé et mesuré tout ce que nous n'avons pas encore compris en matière de transfert de gènes et des principes associés, et nous avons encore beaucoup de domaines à appréhender.

Toutefois, nous avons levé le voile sur quelques facettes du vaste domaine de la vectorologie que nous vous invitons à découvrir.

L'unité INSERM U991 « Foie, métabolismes et cancer », associée à l'Université de Rennes1, au CHU de Rennes et au Centre Régional de Lutte contre le Cancer « Eugène Marquis », constitue un pôle d'excellence de la recherche sur le foie. Le premier chapitre est donc tout naturellement consacré au foie et au carcinome hépatocellulaire. Au regard du sujet de thèse, le manuscrit aurait pu développer uniquement les modèles cellulaires *in vitro* (Chapitre 2) et la vectorisation (Chapitre 3). De plus, la vectorisation des cellules hépatiques se situe à l'interface entre la biologie et la chimie, ce qui justifie également la longueur de l'introduction.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Pascal Loyer au sein de l'unité INSERM 991, en collaboration avec :

- L'équipe CEMCA, Equipe « Phosphore et vectorisation », UMR CNRS 6521, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest
- L'équipe « Synthèses et Activations de Biomolécules », Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), CNRS UMR 6226, Rennes
- L'équipe « Thérapie Génique & Cellulaire » du laboratoire « Génétique Moléculaire et Epidémiologie Génétique », INSERM U613 Hôpital Morvan, CHU de Brest, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, Brest.

Il a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Laurent V, Fraix A, Montier T, Cammas-Marion S, Ribault C, Benvegna T, Jaffrès P-A, Loyer P. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnology Journal*, 5, 314-320.

Dumont J, Jossé R, Lambert C, Anthérieu S, **Laurent V**, Loyer P, Guillouzo A. Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010.

Articles en préparation

- **Laurent V**, Rauch C, Ribault C, Loyer P : Obtention d'une lignée recombinante HepaRG exprimant de façon stable CYP2E1.
- Detivaud L, **Laurent V**, Loréal O, Loyer P : Valorisation de la lignée HepaRG exprimant de façon stable l'hepcidine.
- Huang Z, **Laurent V**, Loyer P, Cammas-Marion S : Evaluation de nanoparticules PMLA pour la vectorisation de drogues anticancéreuses.

Communications à des congrès

Posters

Lecomte S, Nizard P, Le Goff P, Le Dréan Y, **Laurent V**, Wilson MR, Michel D. *Optimization of the retrotranslocation for intracellular protein vectorization*. XXI Journées Scientifiques du Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation Paris, 13-15 décembre 2006.

Laurent V

Cancer du foie. Une stratégie anti-tumorale par transfert de gènes.

Doctoriales® de Bretagne 2007 - Vannes, novembre 2007

Laurent V, Cammas-Marion S, Montier T, Lemiègre L, Jaffrès P-A, Benvegny T, Loyer P.

Transfert de gènes dans les cellules de la lignée d'hépatome HepaRG.

1^{ères} journées aux interfaces Chimie-Biologie-Physique - Rennes, 11-12 décembre 2007.

Laurent V

Cancer du foie. Une stratégie anti-tumorale par transfert de gènes.

Gen2Bio, Les rencontres Biotech OUEST-genopole® - Rennes, 27 mars 2008

Laurent V, Fraix A, Yaouanc J-J, Montier T, Lemiègre L, Benvegny T, Jaffrès P-A, Cammas-Marion S, Loyer P.

Evaluation de méthodes de transfection des cellules HepaRG : Identification de paramètres limitant le transfert de gènes dans les cellules hépatiques.

63^{èmes} journées de l'AFEF - Paris, 24-27 septembre 2008.

Laurent V, Fraix A, Montier T, Cammas-Marion S, Glaise D, Ribault C, Benvegny T, Jaffrès P-A, Loyer P.

Transfert de gène dans les cellules d'hépatome humain HepaRG : Application à la surexpression du cytochrome P450E1.

3^{ème} congrès Génomique Fonctionnelle du Foie - Rennes, 11-12 mars 2010

Communications orales (Exposé des résultats)

4^{ème} Carrefour OUEST-genopole® : *Une gamme de vecteurs synthétiques efficaces et non toxiques pour le transfert de gènes.* Angers, 25 janvier 2007. Thierry Benvegny, Bruno Pitard, Marie Morille (Equipe JP Benoît)

Colloque Axe Vectorisation non virale, plate-forme Explorations Fonctionnelles OUEST-genopole® : *Transfert de gènes dans les cellules hépatiques* - Brest, octobre 2007. Pascal Loyer.

Aurore Fraix, Véronique Laurent, Pascal Loyer, Paul-Alain Jaffrès, Jean-Jacques Yaouanc, Tristan Montier, Pierre Lehn. Congrès Grand Ouest Bretagne-Pays de la Loire, Journées scientifiques de la Société Chimique de France : *Nouveaux lipides cationiques pour la transfection de cellules hépatiques* - Trégastel, 11-13 mai 2009. Présentation par Aurore Fraix.

Journée Cancéropole IBISA : *Plate-forme SynNanoVect - Production de vecteurs de synthèse et vectorisation de biomolécules.* Programme fédérateur Ouest-genopole IBISA 2008 - Rennes, février 2008. Pascal Loyer.

Journée interne de l'Unité INSERM U991 : Cellules HepaRG. Rennes, 4 mars 2009.

Gen2Bio - Les rencontres Biotech organisées par Biogenouest® : *Développement et production de nanovecteurs de synthèse : vectorisation d'acides nucléiques et de principes actifs* - La Baule, 31 mars 2009. Tristan Montier et Sandrine Cammas-Marion.

**Article Master 2 Génomique Fonctionnelle et Santé
(Laboratoire Génétique et Développement, CNRS UMR 6061, Rennes)**

Le Goff C, **Laurent V**, Le Bon K, Tanguy G, Couturier A, Le Goff X, Le Guellec R. 2006. pEg6, a spire family member, is a maternal gene encoding a vegetally localized mRNA in *Xenopus* embryos. *Biol Cell*. 98(12):697-708.

Abréviations

A

AA	Acide Aminé
AAV	Adeno-Associated Virus (Virus Adéno-Associé)
ABC	ATP-Binding Cassette
Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNp	ADN plasmidique
AFM	Microscopie à Force Atomique
AFP	Alpha-FœtoProtéine
Ag	Antigène
AhR	Récepteur Aryl-Hydrocarbure, récepteur aux amines aromatiques hétérocycliques
ALT	ALanine AminoTransférase
AP-1	Activator Protein 1
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
AST	ASpartate Amino Transférase
ATP	Adénosine 5'-TriPhosphate

B

BCL	Protéine anti-apoptotique (B-Cell Lymphoma Protein)
BET	Bromure d'ETHidium
BGTC	Bis-Guanidinium-Tren-Cholestérol
BrdU	BromodéoxyUridine
BSV	Brest Synthetic Vector

C

CAT	CATalase
CASP	Caspase
CD	Marqueur de différenciation (Cluster of differentiation)
CDK	Cycline D Kinase
CEA	Antigène CarcinoEmbryogénique
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
Chol	Cholestérol
CMV	CytoMégaloVirus
cP	CentiPoise
CPP	Cell Penetrating Peptide
CRP	Protéine C-Réactive
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
Cy3	Cyanine 3
CYP	Cytochrome P450

D

Da	Dalton
DC-Chol	3-β-[N-(N',N'- diméthylaminoéthane)- carbamoyl]- cholestérol
DCs	Cellules Dendritiques
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DNases	Enzymes de dégradation de l'ADN
DODA	DiOctADécylamine
DOGS	Di-Octadécylamido-Glycyl-Spermine
DOPE	Di-OléylPhosphatidylEthanolamine
DOPG	Di-OléoylPhosphatidylGlycérol
DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N- [2(sperminocarboxamido)éthyl]N,N- -diméthyl 1-propanium trifluoroacétate
DOTAP	1,2-bis(oléoyloxy)-3- (triméthylammonio)propane
DOTMA	Di-Oléoyloxy-propyl- TriMéthylAmmonium
DPPC	Di-PalmitoylPhosphatidylCholine
DPPES	Di-Palmitoyl-Phosphatidyl- Ethanolamyl-Spermine
DSPC	PhosphatidylCholine disaturée
DTS	DNA nuclear Targeting Sequence

E

EDTA	Ethylène-Diamine-TétraAcétique
EG	Erwan Guénin
EGF	Epidermal Growth Factor (Facteur de croissance épidermale)
EH	Epoxydes Hydrolases
EMX	Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques
EP	Electroporation
EtOH	Ethanol

F

FA	Fluorescéine Amine
FACS	Fluorescence Assisted Cell Sorting (Analyseur-Trieur de cellules)
FCS	Fluorescence Correlation Microscopy
FGF	Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance des fibroblastes)
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
FL	Fluorescence
Flk-1	Récepteur du VEGF
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSC	Forward SCatter, diffusion vers l'avant, « à petit angle » (Granularité)

G

GAG GlycosAminoGlycan
GFP Green Fluorescent Protein
GLB Gwenaëlle Le Bolc'h
GPC3 Glypican-3
GPCR Récepteurs couplés aux protéines G
GR Gildas Réthoré
GST Glutathion S-Transférase

H

HAA Amines Aromatiques Hétérocycliques
HAMP Hepcidin AntiMicrobial Peptide
HBV Virus de l'Hépatite B (VHB)
HCV Virus de l'Hépatite C (VHC)
HepaRG Lignée cellulaire d'hépatome établie par Rumin et Gripon
HGF Hepatocyte Growth Factor (Facteur de croissance des hépatocytes)
HIF Hypoxia Inducible Factor
His Histidine
HP Hépatectomie Partielle
HPLC Chromatographie Liquide à Haute Pression
HSV-1 Virus Simplex Herpes de type 1
hTERT Sous-unité catalytique de la télomérase

I

IC50 Concentration inhibant de 50% un paramètre
ICAM Molécule d'Adhésion InterCellulaire
IFN Interferon
IFN- γ Interféron γ
IgG Immunoglobuline de type G
IKK Kinases spécifiques de la protéine I κ B
IL Interleukine
ImPACcell Plate-forme IBiSA de Biogenouest® d'imagerie-puces à cellules
IP3 Inositol 1,4,5 TriPhosphate
IR Infra-Rouge
IRES Internal Ribosome Entry Site
IV Intraveineuse

K

KI Knock-In
KLN Karine Le Ny
KO Knock-Out

L

LDH Lactate DésHydrogénase
LDL Low Density Lipoprotein (Lipoprotéine faible densité)
Lipofection Transfection cellulaire réalisée à l'aide de liposomes
Lipoplexes Complexes formés par l'ADN et des liposomes cationiques
LPC Cellules Progénitrices du Foie

LPS Lipopolysaccharide
Luc Gène de la luciférase
LUV Large Unilamellar Vesicle

M

(m, μ) g (milli, micro) gramme
(m, μ) L (milli, micro) litre
(m, μ) mol (milli, micro) mole
(m, μ) M (milli, micro) molaire
MAGE Melanoma-Associated Antigen
MAPK MAP Kinase
MART1/MelanA Melanoma Antigen Recognized by T cells / Melanoma Antigen A, antigène A du mélanome
Mdr Gène de Résistance Multi Drogue
MEC Matrice Extra-Cellulaire
MeIQx 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline
MEM Minimal Essential Medium
min Minute
miRNA Micro ARN interférents
MLV Multilamellar Vesicle
MM18 Marie-Laure Miramon 18 Carbones
MMP Matrix Metallo Protéinase
MPF Mitosis Promoting Factor

N

NaN3 Azide de Sodium
NAT N-AcetylTransférases
ND Non Déterminé
NF κ B Nuclear Factor kappa B
NLS Signal de Localisation Nucléaire
nm Nanomètre
NPC Complexe du Pore Nucléaire
NT Non Transfecté

O

OptiMEM Milieu optimisé pour les transfections

P

p53 Gène suppresseur de tumeur
PAMAM Dendrimère de poly(amidoamide)
PAs Système Activateur du Plasminogène
pb Paire de bases
PBS Solution saline tamponnée au phosphate, Phosphate Buffered Solutions
PC PhosphatidylCholine
pC3 pEGFP-C3 délété du cDNA GFP
PCR Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDGF Platelet-Derived Growth Factor
PEG PolyEthylène Glycol
pEGFP-C3 Plasmide Enhanced Green Fluorescent Protein (GFP)
PEI PolyEthylèneImine
PEI-HIS PolyEthylèneImine histidylée
PI3K Phospho-Inositol-3 Kinase

PIP2 PhosphoInositol 2 Phosphate
PhIP 2-Amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
PKA Protéine Kinase A
PKC Protéine Kinase C
PLC Phospholipase C
PLL Poly-L-Lysine
pLL-His Poly-L-Lysine histidylée
PMLA PoLy Acide Malique
PMLA-Be Poly-Benzyl-Malate
PMLA-Bio Nanoparticule de PMLA-Be, 62 molécules de PEG et biotine
PMLA-He Poly-Hexyl-Malate
PMLA-Me Nanoparticule de PMLA-Be, 42 molécules de PEG et méthyle
Polyplexes Complexes formés par l'ADN et des polymères cationiques

R

R Rapport de charges
Rb Protéine du Rétinoblastome
RE Réticulum Endoplasmique
RGD Arginine-Glycine-Acide aspartique
RLU Unité de Lumière Relative
RMN Résonance Magnétique Nucléaire
RNP Complexe ribonucléoprotéique
ROS Espèces réactives de l'oxygène (ERO)
RTK Récepteurs à activité Tyrosine Kinase
RT-PCR Réverse Transcription puis Réaction de Polymérisation en Chaîne

S

siRNA Petits ARN interférents (siARN)
shRNA Petits ARN en épingle à cheveux
SCID-X ImmunoDéficience Sévère Combinée liée au chromosome X (Severe Combined Immunodeficiency Diseases)
SSC Side Scatter, diffusion latérale, « à grand angle » (Taille)
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
SULT SULfo-Transférases
SUV Small Unilamellar Vesicle
SV40 Virus Simien 40
SVF Sérum de Veau Fœtal
SynNanovect Plate-forme IBiSA de Biogenouest® de production et de formulation de vecteurs de synthèse pour le transfert de gènes et de biomolécules in vitro et in vivo

T

TAT Facteur activateur de la transcription chez le HIV-1
TBE Tris-Borate EDTA
Tf Transferrine
TGF-β Facteur de croissance transformant β
TIMP Tissue Inhibitor of MetalloProteinases
TLR Récepteur Toll-Like
TNFα Tumeur Necrosis Factor α
t-PA Activateur tissulaire du Plasminogène

U

UA Unités Arbitraires
UGT UDP-GlucuronosylTransférases
uPA Urokinase Activatrice du Plasminogène
uPAR Récepteur de l'Urokinase
UTR Région non codante
UV Ultraviolet

V

VEGF Facteur de croissance de l'épithélium vasculaire
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine

X

XRE Elément de Réponse aux Xénobiotiques

Liste des figures

Introduction

Chapitre 1. Le foie

Figure 1.	Projection sur la paroi abdominale antérieure	3
Figure 2.	Vue antérieure du foie	3
Figure 3.	Vue inférieure du foie et de la vésicule biliaire	4
Figure 4.	Vue postérieure du foie	4
Figure 5.	Situation du foie	5
Figure 6.	Empreintes sur la face viscérale du foie	5
Figure 7.	Segments hépatiques	5
Figure 8.	Structure lobulaire normale du foie	6
Figure 9.	Structure d'un lobule hépatique	6
Figure 10.	Organisation structurale du foie : lobule et acinus	7
Figure 11.	Système des vaisseaux et des conduits intra-hépatiques	8
Figure 12.	Microcirculation hépatique	9
Figure 13.	Vésicule biliaire et voies biliaires	9
Figure 14.	Histologie de foie de souris	10
Figure 15.	Hépatocyte	12
Figure 16.	Détoxication des xénobiotiques	14
Figure 17.	Structure schématique du cytochrome P450	16
Figure 18.	Mode d'action de l'enzyme NADPH P450 réductase	17
Figure 19.	Importance relative des cytochromes P450 dans le métabolisme des drogues	18
Figure 20.	Quantités relatives des cytochromes P450 dans le foie	18
Figure 21.	Principales drogues métabolisées par les cytochromes	18
Figure 22.	Principaux transporteurs hépatocytaires et cholangiocytaires	19
Figure 23.	Régulation pathophysiologique des transporteurs hépatiques	20
Figure 24.	L'équilibre mort cellulaire/prolifération	21
Figure 25.	Localisation des LPC	23
Figure 26.	Modèles expérimentaux couramment utilisés pour la régénération médiée par les LPC	23
Figure 27.	Cinétique de régénération hépatique	24
Figure 28.	Interactions entre différents types cellulaires hépatiques impliqués dans la régénération hépatique	25
Figure 29.	Chronologie des événements clés arrivant aux stades précoces de la régénération hépatique après hépatectomie partielle	25
Figure 30.	Etapes de la régénération hépatique	26
Figure 31.	Interaction entre HGF et TGFβ1 pendant l'initiation de la régénération hépatique	27
Figure 32.	Schéma des boucles de feedback entre les facteurs de croissance TGFβ1, et la matrice extracellulaire, contrôlant les stades précoces et tardifs de la régénération	29
Figure 33.	Voies de régénération hépatique suite à une hépatectomie	30
Figure 34.	Représentation schématique des deux voies de régénération impliquées dans la réparation du foie	31
Figure 35.	Régulation du cycle cellulaire	32
Figure 36.	Fréquence estimée de diverses maladies du foie en France en 2006	34
Figure 37.	Les 7 caractéristiques fonctionnelles acquises du cancer	35
Figure 38.	Les différentes voies de la cancérogenèse	35
Figure 39.	Les 3 étapes de la cancérogenèse	36
Figure 40.	Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse pour les différents facteurs de risque	38
Figure 41.	Progression histopathologique et caractéristiques moléculaires du CHC	38
Figure 42.	Pathogénèse du CHC	39
Figure 43.	Pathogénèse du CHC	39
Figure 44.	Les voies de la cancérogenèse hépatique définies par les altérations génétiques et leurs relations avec les paramètres cliniques	41
Figure 45.	Profil macroscopique du CHC selon le statut de la β-caténine	41
Figure 46.	Séquence chronologique des lésions cellulaires aboutissant au développement du CHC chez l'Homme	42
Figure 47.	Voies de signalisation cellulaires impliquées dans le CHC	42
Figure 48.	Voies de signalisation cellulaires affectées dans le CHC selon les facteurs de risques	42
Figure 49.	Schématisation des différents sous-groupes de CHC définis de G1 à G6 par analyse transcriptomique avec leurs corrélations génétiques et cliniques	43
Figure 50.	Modèle proposé expliquant l'origine cellulaire des tumeurs malignes du foie	44
Figure 51.	Principales étapes de la carcinogénèse hépatique	45
Figure 52.	Causes des carcinomes hépato-cellulaires	45
Figure 53.	Tumeur maligne du foie (CHC)	47
Figure 54.	Modèle du réseau hépatique vasculaire	47
Figure 55.	Evolution de l'apport sanguin pendant la carcinogénèse hépatique	47

Figure 56.	Comparaison d'images IRM a) simulées et b) réelles d'un foie atteint d'un carcinome hépatocellulaire	48
Figure 57.	Principaux critères des classifications	48
Figure 58.	Classification fonctionnelle des 29 protéines différentielles exprimées identifiées dans le CHC	50
Figure 59.	L'expression des micro-ARN est associée à différents sous-groupes de tumeurs hépatocellulaires	51
Figure 60.	Signatures des micro ARN dans le CHC	51
Figure 61.	Proposition d'un algorithme de traitement du carcinome hépatocellulaire	52
Figure 62.	Proposition de stratégie pour le traitement du CHC	53

Chapitre 2. Les modèles in vitro

Figure 63.	Modèles cellulaires hépatiques	60
Figure 64.	Avantages et limites des préparations de foie in vitro	60
Figure 65.	Etablissement de la lignée HBG au laboratoire	63
Figure 66.	Morphologie des cellules de la lignée HepaRG	64
Figure 66bis.	Expression des fonctions spécifiques du foie des cellules HepaRG	65
Figure 67.	Suivi du décollement sélectif d'une culture différenciée HepaRG	66

Chapitre 3. Vectorisation non virale : méthodes et applications

Figure 68.	Principe du transfert de gènes	68
Figure 69.	Méthodes physiques, chimiques et biologiques pour le transfert de gènes	69
Figure 70.	Détail des différentes classes de vecteurs synthétiques	70
Figure 71.	Critères de l'efficacité du vecteur	70
Figure 72.	Evolution des vecteurs	71
Figure 73.	Principales méthodes physiques dans le transfert de gènes	72
Figure 74.	Nucléofecteur® (Amaya)	74
Figure 75.	Microporator® (Neon Transfection System - Invitrogen)	75
Figure 76.	Représentation schématique du transfert de gènes médié par des nanoparticules magnétiques in vitro	75
Figure 77.	Représentation schématique du transfert de gènes médié par des nanoparticules magnétiques in vivo	75
Figure 78.	Ciblage tumoral par des particules magnétiques	76
Figure 79.	Transfert de gènes non invasif dans le foie d'une souris par massage mécanique	77
Figure 80.	Photographies d'acides nucléiques seules ou compactées dans des vecteurs	77
Figure 81.	Formation d'un lipoplexe ou d'un polyplex	78
Figure 82.	Transfection des cellules CV-1 et COS-7 par le plasmide pSV2cat complexé au lipide PtdEtn/DOTMA (1:1)	79
Figure 83.	Tableau des compositions des molécules commerciales	79
Figure 84.	Représentation d'un liposome	80
Figure 85.	Représentation schématique d'un lipide cationique	81
Figure 86.	Structures chimiques des DOTMA, DOTAP, DMRIE et DOTIM	82
Figure 87.	Structure chimique du DOGS	82
Figure 88.	Structures chimiques des DC-Chol et BGTC	83
Figure 89.	Structure chimique de la DOPE	83
Figure 90.	Structure chimique du cholestérol	83
Figure 91.	Structure chimique du GR	84
Figure 92.	Préparation des liposomes et archaeosomes	84
Figure 93.	Cavités hydrophobe et hydrophile	84
Figure 94.	Dimensions d'un liposome unilamellaire	85
Figure 95.	Liposomes visualisés par microscopie optique (à gauche) et électronique à transmission (à droite)	85
Figure 96.	Ultrastructure des complexes cationiques liposomes/ADN (lipoplexes)	85
Figure 97.	Structure des agrégats supramoléculaires ADN/lipide cationique	86
Figure 98.	Interactions électrostatiques ADN/Vecteur (liposomes ou polysomes)	86
Figure 99.	Transfection médiée par les lipoplexes et endocytose	87
Figure 100.	Efficacité de transfection en fonction de la quantité d'ADN et du CR	88
Figure 101.	Stabilité des lipoplexes selon le CR	88
Figure 102.	Structure des lipoplexes selon le rapport des charges cationiques du vecteur sur les charges anioniques de l'ADN	89
Figure 103.	Images de microscopie par force atomique de lipoplexes selon le CR	90
Figure 104.	Les effets sélectifs des traitements pharmacologiques procurent un outil de diagnostic pour distinguer les voies de pinocytose	91
Figure 105.	Les multiples voies d'endocytose dans les cellules de mammifères	91
Figure 106.	Hypothèse de sortie de l'endosome des lipoplexes et polyplexes	92
Figure 107.	Représentation schématique des barrières cellulaires du trafic nucléocytoplasmique de l'ADN plasmidique	93
Figure 108.	Pore nucléaire	94
Figure 109.	Effet de la position dans le cycle sur l'efficacité du transfert de gènes	94
Figure 110.	Représentation schématique du mécanisme d'entrée nucléaire par les complexes des pores nucléaires	95

Figure 111. Photo de la condensation de l'ADN par la polylysine	96
Figure 112. Structures chimiques des polymères PEI, PLL, PAMAM et chitosan	97
Figure 113. Polyfection	98
Figure 114. Endocytose non-spécifique d'un lipoplexe (lipopolyamine/ADN)	98
Figure 115. Nanoparticule Transdrug®	100
Figure 116. Phases des essais cliniques des nanomédicaments de BioAlliance Pharma	100
Figure 117. Les différents types de nanovecteurs	101
Figure 118. Représentation d'une nanocapsule	102
Figure 119. Structure du complexe lipophile	102
Figure 120. Image TEMP après injection de nanovecteurs	102
Figure 121. Représentation d'une nanosphère	103
Figure 122. Choix du nanovecteur selon la stratégie	103
Figure 123. Peptides vecteurs et leurs origines	104
Figure 124. Schéma du trafic intracellulaire de la protéine chimère et sa protéolyse « sélective » permettant de libérer le peptide bioactif	105
Figure 125. Représentation schématique de la séquence chimérique codant une protéine de fusion composée, de l'extrémité amino- à carboxy terminale	105
Figure 126. Vectorisation de protéines thérapeutiques recombinantes du milieu extracellulaire jusqu'au cytosol	106
Figure 127. Applications du transfert d'ADN in vitro	108
Figure 128. Maladies monogéniques candidates à la thérapie génique	109
Figure 129. Protocoles de thérapie génique	110
Figure 130. Indications des essais cliniques de thérapie génique en 2009	110
Figure 131. Phases des essais cliniques de thérapie génique en 2009	111
Figure 132. Nombre d'essais cliniques de thérapie génique approuvés dans le monde (1989-2009)	111
Figure 133. Les deux voies de la thérapie génique, in vivo et ex vivo	112
Figure 134. Classes de gènes transfectés dans les essais cliniques de thérapie génique	113
Figure 135. Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique	113
Figure 136. Classes et noms des gènes utilisés seuls ou associés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009	115
Figure 137. Pistes de thérapie génique en oncologie	116
Figure 138. Transfert d'un gène suppresseur de tumeur	117
Figure 139. Thérapie par gènes suicides	119
Figure 140. Représentation schématique du transfert du gène suicide codant pour la thymidine kinase herpétique (Tk) par un vecteur adénoviral, associé à un traitement par ganciclovir (GCV)	119
Figure 141. Gène suicide et effets de voisinage/bystander	120
Figure 142. Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009	120
Figure 143. Complexe vecteur/ADN portant des éléments de furtivité (PEG) et des ligands ciblant les récepteurs cibles des cellules à transfecter	121
Figure 144. Exemple d'immunothérapie par lipopolyplexes	121
Figure 145. Lipophosphoramidate monocationique	121
Figure 146. Nanocapsules lipidiques (LNC) stabilisées par de longues chaînes de PEG	122
Figure 147. Tableau des essais cliniques de thérapie génique du cancer du foie et du CHC	123

Résultats

Résultats 1

Partie A.

Figure 1. Transfection des cellules HepaRG cells par des réactifs commerciaux	132
Figure 2. Première sélection des conditions de transfection par lipides cationiques	133
Figure 3. Structure des lipides et colipides	135
Figure 4. Transfection des cellules HepaRG par des lipides cationiques appartenant aux lipophosphonates, lipophosphoramidates et lipides glycine bêtaïne	139
Figure 5. Paramètres physico-chimiques des liposomes	140
Figure 6. Mesures de la taille par diffusion de la lumière à J0 et J7 des liposomes et des lipoplexes MM18, MM18-Chol5%	141
Figure 7. Mesures physico-chimiques des liposomes versus lipoplexes	141
Figure 8. Mesures physico-chimiques des liposomes et des lipoplexes BSV10-DOPE 50% dans l'OptiMEM et le milieu de culture	142
Figure 9. Transfection de cellules HepaRG progénitrices et différenciées par électroporation	143
Figure 10. Relations entre quantités d'ADN et efficacités de transfection	144
Figure 11. Conditions de lipofection et d'électroporation des cellules HepaRG	145
Figure 12. Corrélation entre quantité de plasmides et expression GFP	146
Figure 13. Surexpression transitoire du CYP2E1 dans les cellules HepaRG différenciées	148
Figure 14. Surexpression transitoire du CYP2E1 et de la GFP dans les cellules HepaRG progénitrices et différenciées	149
Figure 15. Séquence partielle (1-180 pb) du messager du CYP2E1 insuline-dépendant	151

Partie B.

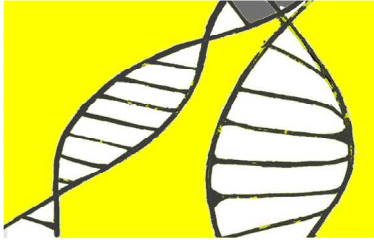
Figure 16.	Visualisation des siARN marqués à la Rhodamine en microscopie à fluorescence	155
Figure 17.	Rôle du récepteur AhR dans l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 induite par les HAA dans les cellules HepaRG	156
Figure 18.	Effet du PhIP et du MeIQx sur l'activité du promoteur CYP1A1 dans les cellules HepaRG en transfection transitoire	157

Résultats 2

Figure 1.	Régulations possibles de la synthèse de l'hepcidine en réponse à différentes situations physiologiques associées à des désordres du métabolisme du fer	159
Figure 2.	Vecteur d'expression pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) dans lequel est inséré le cDNA hepcidine-GFP	160
Figure 3.	Photographies des cellules électroporées et sélectionnées par l'antibiotique G418 et par sélection des cellules GFP+ cytométrie en flux	161
Figure 4.	Photographies à faible (haut, 1 ^{ère} ligne) et fort (bas, 2 ^{ème} ligne) grossissements des cellules HepaRG différenciées exprimant la protéine hepcidine-GFP	162
Figure 5.	Etapes de la maturation de l'hepcidine	163
Figure 6.	Formes possibles de la protéine de fusion hepcidine-GFP	163
Figure 7.	Détection de la protéine de fusion hepcidine-GFP par Western-blot avec un anticorps anti-GFP dans les cellules HepaRG et le milieu	164
Figure 8.	Modèle du mécanisme d'action de l'hepcidine	166

Résultats 3

Figure 1.	Protocole du screening de molécules d'intérêt utilisé par la plate-forme ImpACcell	169
Figure 2.	Structure du PMLA modulable grâce à la fonction acide carboxylique latérale	170
Figure 3.	Paramètres physico-chimiques des nanoparticules	171
Figure 4.	Effets sur la densité cellulaire des nanoparticules PMLA	172
Figure 5.	Viabilité cellulaire de la lignée HuH7 en fonction de la concentration en doxorubicine encapsulée ou non dans les nanoparticules	173
Figure 6.	Activités caspases de lysats de cellules HuH7 induites par les nanoparticules (PMLA-Be, PEG-PMLA-Be et Biotine-PEG-PMLA-Be) vides ou encapsulant la doxorubicine versus la doxorubicine libre	174
Figure 7.	IC50 des différents principes actifs	176
Figure 8.	Viabilité cellulaire de la lignée HuH7 en fonction de la concentration BJFP1022 encapsulé ou non dans les nanoparticules	176



INTRODUCTION

*« En recherche, l'inspiration et la curiosité sont irremplaçables »
Carol Greider, 100^{ème} Prix Nobel de médecine, 5 octobre 2009.*

Chapitre 1.

Le Foie

I. Généralités sur le foie

1. Anatomie

Le FOIE est l'organe le plus volumineux du corps humain, d'un poids moyen de 1500 g à 1800 g chez l'adulte.

Il occupe la partie supérieure de la cavité abdominale, sous la coupole diaphragmatique droite et est presque totalement enfoui sous les côtes. Il est recouvert par le diaphragme, la plèvre et le poumon.

Son bord inférieur correspond au rebord costal droit. Le foie remplit l'hypochondre droit, et s'étend dans l'hypochondre gauche (figure 1).

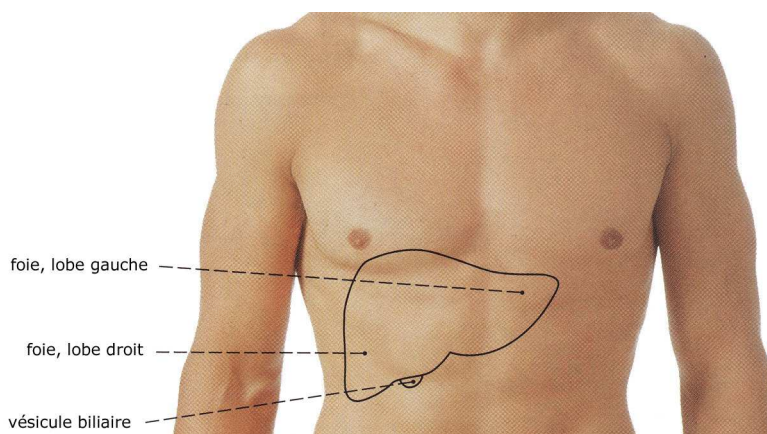


Figure 1. Projection sur la paroi abdominale antérieure. Respiration en position intermédiaire. La position du foie dépend essentiellement de la respiration. D'après Putz R, Pabst R. Atlas d'anatomie humaine Sobotta. Tome 2, Tronc, viscères, membre inférieur. 4^{ème} édition française. Paris: Technique et Documentation, 2000, 403 p.

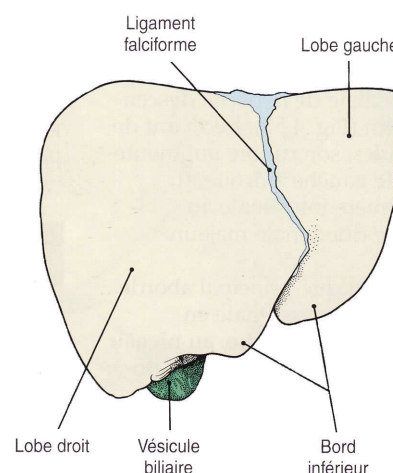
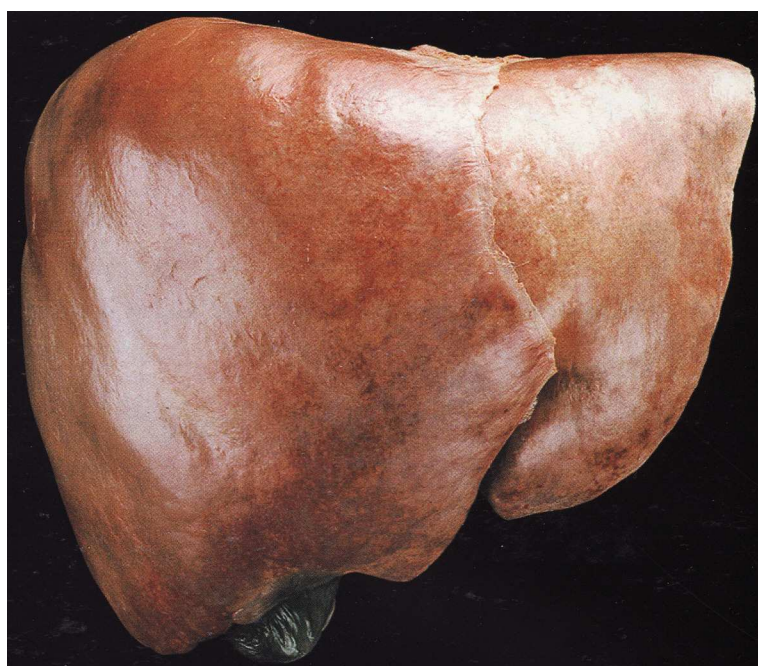


Figure 2. Vue antérieure du foie.

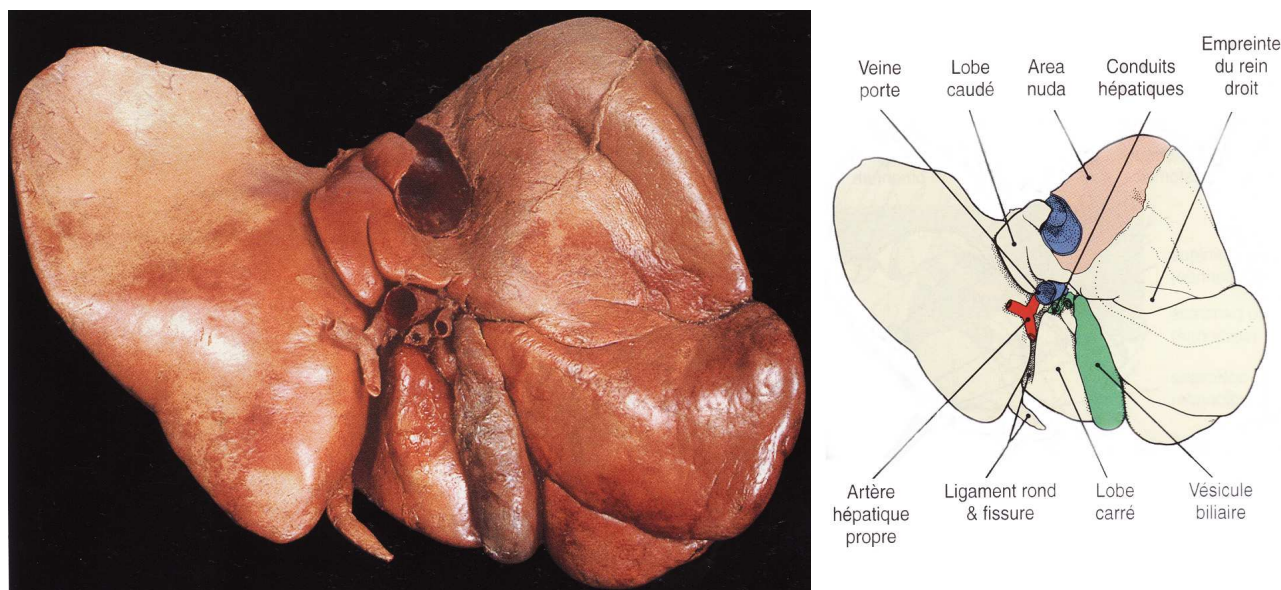


Figure 3. Vue inférieure du foie et de la vésicule biliaire montrant le hile du foie et sa face viscérale.

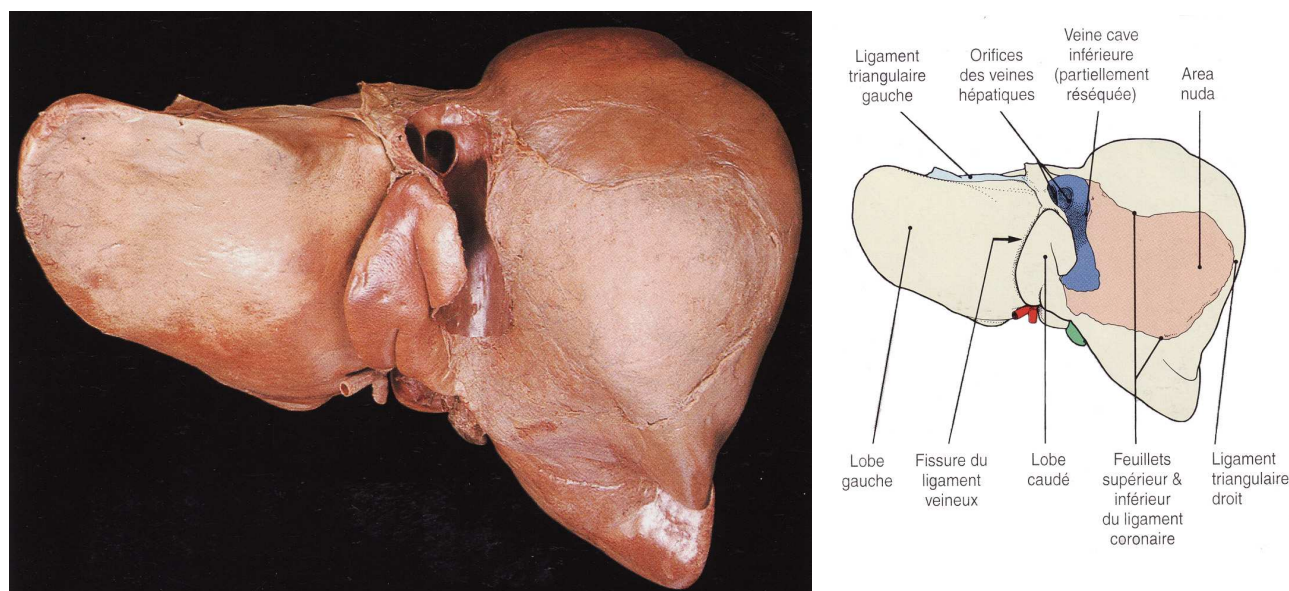


Figure 4. Vue postérieure du foie. Figures 2, 3 et 4 d'après Gosling JA, Harris PF, Whitmore I, William PLT. Anatomie humaine : atlas en couleurs. 2ème édition française. Bruxelles : De Boeck, 2003, 377 p.

Le foie (figures 2, 3, 4) est enveloppé d'une capsule de tissu conjonctif appelé capsule de Glisson, surmontée de péritoine viscéral. C'est donc un organe intrapéritonéal jusqu'à l'*area nuda*, « zone nue » non péritonisée du foie centrée sur la veine cave inférieure, en contact avec la glande surrénale droite et adhérente au diaphragme par du tissu conjonctif de sorte que le foie est ancré dans la cavité péritonéale. L'*area nuda* est limitée par les deux feuillets du ligament coronaire qui convergent en ligament triangulaire droit.

Deux faces se distinguent : une face diaphragmatique (antérieure) convexe et une face viscérale (inférieure) plane ou concave plus complexe, séparées par un bord inférieur tranchant. Toute la surface externe du foie étant tapissée de péritoine, elle est lisse comme un miroir. La disposition du péritoine autour du foie est à l'origine de différents espaces importants en clinique car ils peuvent être le siège d'accumulations de liquides.

Par exemple, à la suite d'une cirrhose, peut survenir une absence de réabsorption du liquide péritonéal appelée **ascite** qui entraîne une accumulation de liquide et le gonflement de la cavité péritonéale.

La plus grande partie de la face diaphragmatique correspond à la face antérieure qui est divisée en deux lobes principaux, les lobes hépatiques droit (2/3 du foie total) et gauche, par le ligament falciforme. Deux lobes mineurs, dénommés lobe caudé (ou lobe de Spigel) et lobe carré, figurent sur la face viscérale. Cette dernière contient le hile ou porte du foie où entrent et sortent les pédicules (voies biliaires, artère hépatique, veine porte) entourés de tissu collagène constituant la **triade porte** des vaisseaux. La vésicule biliaire est attenante à cette face, débordant le bord inférieur du foie et orientant son col vers le hile où elle entre en contact avec les voies biliaires extrahépatiques.

La face viscérale comporte les empreintes des organes voisins : œsophage, estomac, duodénum, côlon, rein droit et glande surrénale droite (figures 5, 6).

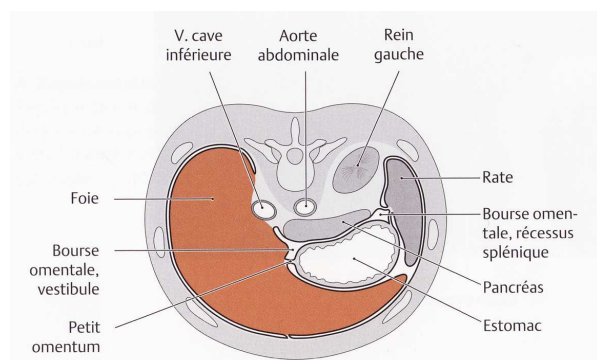


Figure 5. Situation du foie. Coupe horizontale de l'abdomen passant à hauteur de T12/L1. Vue crâniale. Le foie est intrapéritonéal jusqu'à l'*area nuda* non visible ici. Le lobe gauche du foie passe devant l'estomac jusqu'à l'hypochondre gauche. On peut voir la réflexion péritonéale comprise entre le foie et la petite courbure gastrique (petit omentum). Des parties du foie forment la limite droite de la bourse omentale.

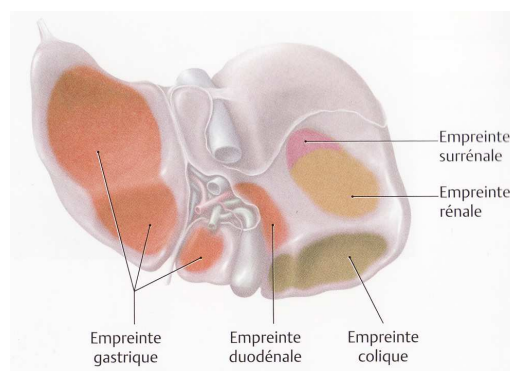


Figure 6. Empreintes sur la face viscérale du foie. Vue de la face viscérale.

Figures 5 et 6 d'après Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Atlas d'Anatomie Prométhée. Cou et organes internes. Paris : Maloine, 2007, 370 p.

2. Architecture

a. Segmentation

Si le foie est divisé en lobes anatomiques, il est séparé selon la classification de Couinaud (1957) en huit segments hépatiques fonctionnellement indépendants en suivant le mode de division de la triade porte (figure 7). Chaque segment est réséquable chirurgicalement, car en recevant une branche de la triade porte, chacun dispose de sa propre vascularisation et de son drainage biliaire, ce qui permet d'envisager des lobectomies et des segmentectomies hépatiques.

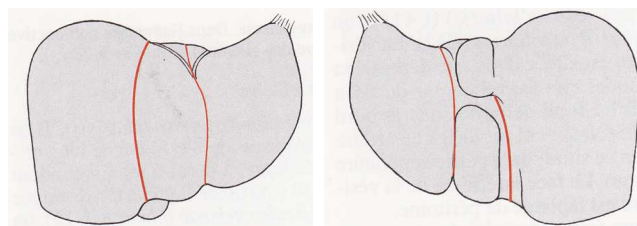


Figure 7. Segments hépatiques. Vues antérieure et postérieure.

D'après Fritsch H, Kühnel W. Atlas de poche d'Anatomie 2 : viscères. 4ème édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007, 449 p.

b. Structure microscopique

A l'échelle microscopique (figures 8, 9), les principales cellules du foie, appelées hépatocytes, sont empilées en travées monocouches ou **travées de Remak** qui s'entrecroisent à l'instar des rayons de miel, en structures polyédriques. Chaque angle est occupé par une **triade porte** ou un **espace porte** ou encore appelé **espace de Kiernan**. Entre les membranes plasmiques des hépatocytes adjacents passent de fins canaux sans paroi propre appelés **canalicules biliaires** qui véhiculent la bile sécrétée par les hépatocytes. Les multiples petits passages entre les parois sont principalement remplis par les **sinusoïdes**, canaux sanguins, qui se comportent comme des capillaires. L'**espace de Disse**, situé entre les hépatocytes et les sinusoïdes (tapissés d'un endothélium fenêtré), permet le transfert de substances dans les deux sens. Chacun de ces groupes de cellules constitue une structure fonctionnelle appelée **lobule hépatique**. De structure hexagonale en coupe transversale, d'un diamètre moyen de 0,25 mm et est drainé par une **veine centrale** ou **centro-lobulaire**.

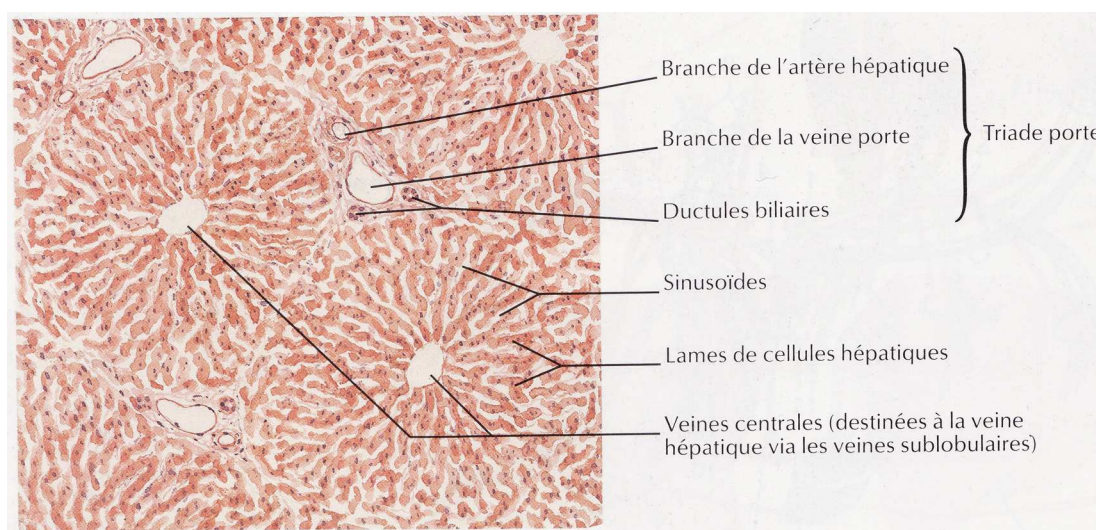


Figure 8. Structure lobulaire normale du foie.

D'après Netter FH. Atlas d'anatomie humaine. 3ème édition Paris : Masson, 2004, 542 p.

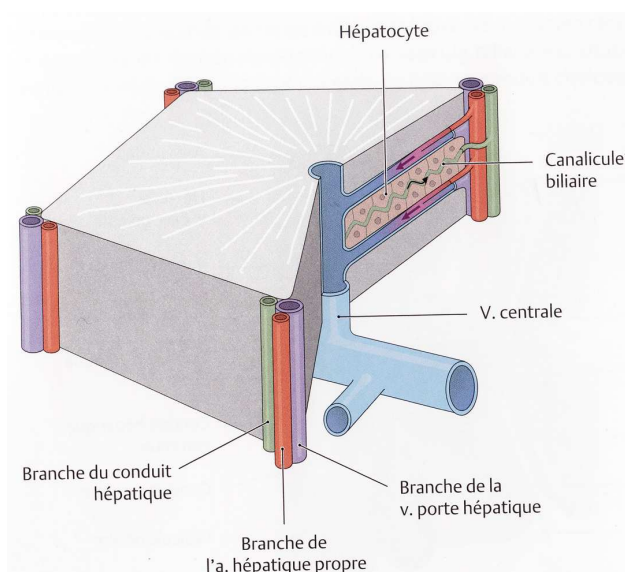


Figure 9. Structure d'un lobule hépatique.

Ce modèle structural a été développé à partir de l'étude de nombreuses coupes histologiques. Il propose une représentation d'un lobule hépatique dans l'espace. Il montre que le lobule polyédrique se compose d'hépatocytes comportant une veine centrale au milieu. Elle permet au sang de se rendre vers les veines hépatiques. La triade périportale est située dans ce modèle entre deux lobules voisins, là où ils se réunissent. Alors qu'artères et veines interlobulaires conduisent leur sang vers le sinus dont la paroi est solide, les conduits biliaires qui véhiculent la bile vers le conduit interlobulaire n'ont pas de paroi propre, passent aussi entre les hépatocytes, même si c'est de l'autre côté.

D'après Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Atlas d'anatomie Prométhée : cou et organes internes. Paris : Maloine, 2007, 370 p.

En parallèle, la conception architecturale de Rappaport propose de considérer l'**acinus hépatique** (figure 10) comme l'unité structurale fonctionnelle du foie en lieu et place du lobule hépatique répondant davantage à la définition de la fonction hépatique.

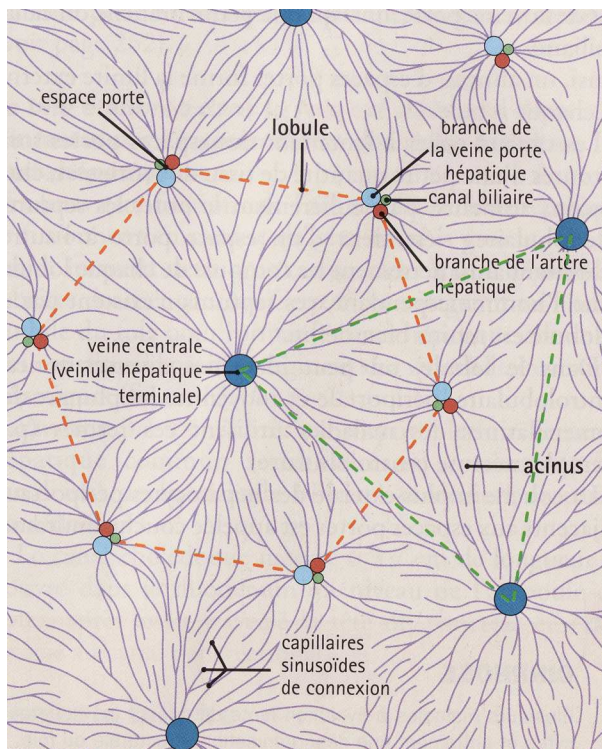


Figure 10. Organisation structurale du foie : lobule et acinus. Schéma de la structure du foie et des relations entre vaisseaux et canaux biliaires, capillaires sinusoides et veines centrolobulaires. Les concepts de lobule (orange) et d'acinus (vert) sont en surimpression.

D'après Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3ème édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p.

Si le centre du lobule hépatique est la veine centrale, l'acinus hépatique est centré sur l'espace porte. De forme généralement triangulaire en coupe transversale, il est délimité par trois veines centrales et se divise en trois zones arciformes comportant des hépatocytes aux fonctions métaboliques distinctes.

Les hépatocytes contigus à l'espace porte (zone périportale ou afférente), recevant le sang le plus oxygéné, contiennent des enzymes de la réaction oxydative et élaborent et stockent du glycogène et des protéines. En revanche, ceux attenants aux veines centrales, où le sang est le moins oxygéné, contiennent beaucoup d'estérases impliquées dans les réactions de conjugaison de détoxification mais peu d'enzymes oxydatives (zone centrolobulaire ou efférente). Les hépatocytes intermédiaires ont des propriétés homonymes (zone médiolobulaire).

La conception de Rappaport est en conformité avec la structure générale des glandes sécrétrices car l'acinus est ici centré sur le canal sécréteur qui est le canal biliaire de l'espace porte.

3. Vascularisation, drainage lymphatique, innervation

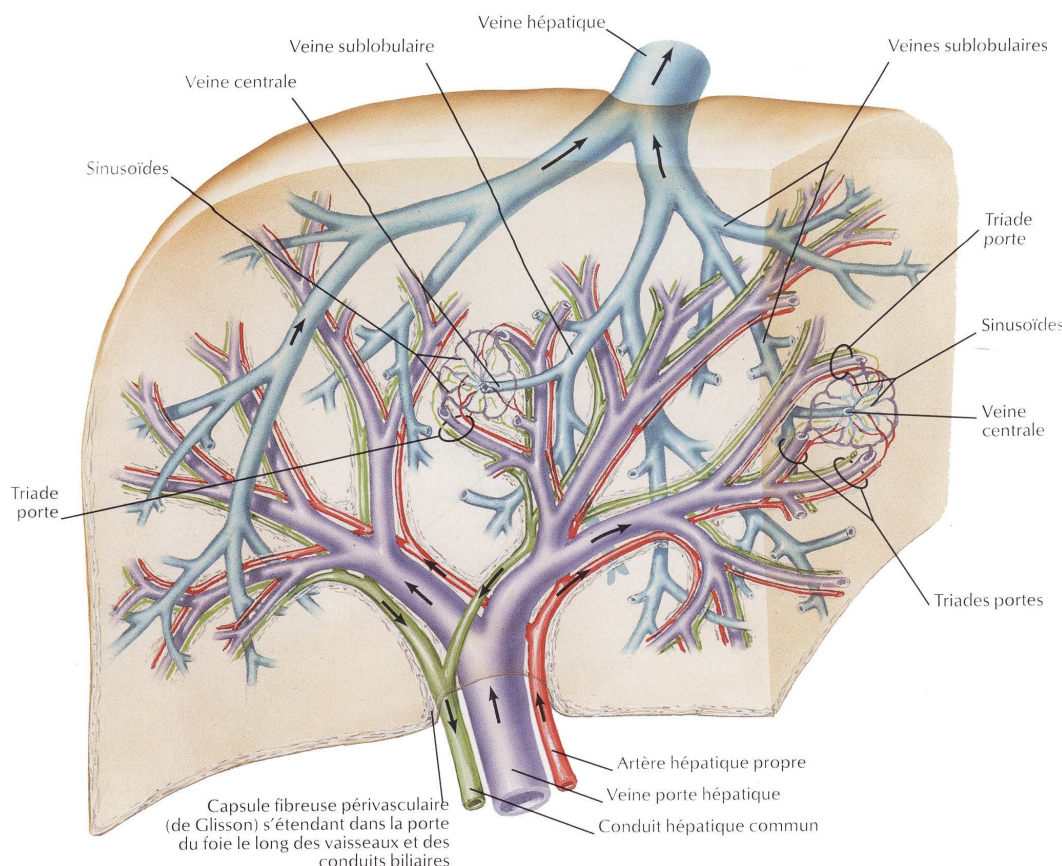


Figure 11. Système des vaisseaux et des conduits intra-hépatiques.

D'après Netter FH. Atlas d'anatomie humaine. 3ème édition. Paris : Masson, 2004, 542 p.

Le foie est irrigué par **deux circulations sanguines afférentes** (figure 11) :

- **l'artère hépatique** provenant des branches du tronc coeliaque issu de l'aorte approvisionne le foie en sang oxygéné représentant 20 à 25% du sang reçu par le foie. Il est distribué aux structures non-parenchymateuses, notamment aux conduits intrahépatiques.
- la **veine porte** fournit 75 à 80% du sang au foie qui est destiné au parenchyme hépatique (hépatocytes). Il contient 40% d'oxygène de plus que le sang qui retourne au cœur par le circuit systémique. Ce sang provient du tube digestif (riche en acides aminés, lipides et glucides absorbés par l'intestin) et de la rate (riche en produits de dégradation de l'hémoglobine).
A l'exception de la graisse, tous les nutriments absorbés à partir du tractus gastro-intestinal sont apportés par le système veineux porte.

Après leur entrée dans le foie par le hile, ces deux vaisseaux se ramifient de manière répétée. Leurs branches terminales cheminent dans les espaces portes pour se déverser dans les sinusoides où le sang artériel se mélange avec le sang du système veineux porte. Les sinusoides irriguent ainsi la totalité du foie.

A l'échelle d'un lobule hépatique, la circulation sanguine va de la périphérie vers le centre, elle est dite centripète. Le sang des branches de l'artère hépatique et de la veine porte de chaque espace porte gagne les sinusoides avant de se drainer dans les veines centrolobulaires. Les veines centrolobulaires se vident finalement dans les veines sus-hépatiques. La circulation **efférente** draine le sang veineux du foie désoxygéné, dans la veine cave inférieure de la circulation générale.

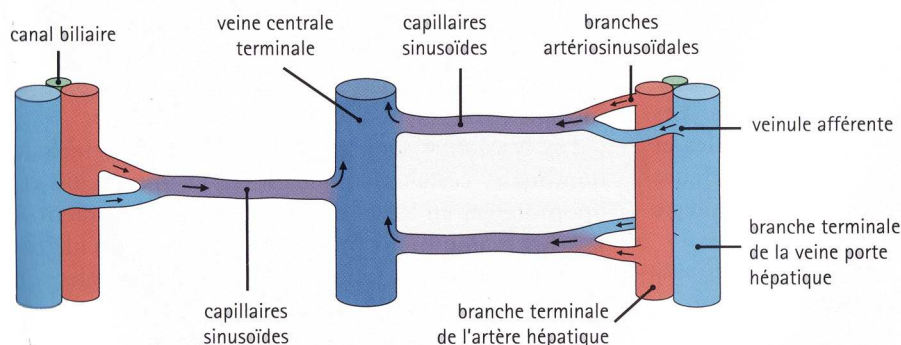


Figure 12. Microcirculation hépatique. Le sang des rameaux terminaux de l'artère hépatique et de la veine porte pénètre dans le sinusoides par de fines branches, la branche artériossinusoidale et la veinule afférente. Puis, il suit la lumière du sinusoides vers la veinule hépatique terminale (veine centrale). Le système sinusoidal est une interconnexion de canaux de type capillaire en étroit contact avec les hépatocytes fonctionnels.

D'après Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3ème édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p.

La **bile**, produite par les hépatocytes à partir de métabolites de l'hémoglobine, est collectée par l'ensemble des canalicules biliaires qui la ramènent à partir des veines centrolobulaires vers les espaces portes au niveau du conduit biliaire, c'est-à-dire, inversement à la circulation sanguine. C'est une circulation centrifuge, du centre vers la périphérie des lobules hépatiques (figure 12).

Les conduits biliaires s'anastomosent pour former les canaux hépatiques droit et gauche au niveau du hile puis le canal hépatique commun. La bile peut être transportée soit vers la vésicule biliaire par le canal cystique pour y être concentrée et entreposée, soit vers le duodénum par le canal cholédoque. Sous l'effet de la cholécystokinine, libérée par une activation du duodénum et du jéjunum, la bile est évacuée de la vésicule biliaire vers le duodénum (figure 13).

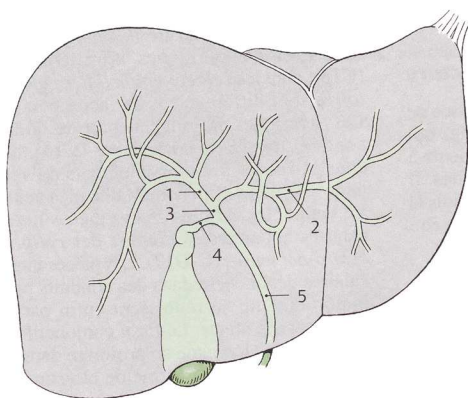


Figure 13. Vésicule biliaire et voies biliaires.

Au niveau du hile, les conduits hépatiques droit (1) et gauche (2) confluent en un conduit hépatique commun (3). Il se prolonge en conduit cholédoque (5) après avoir reçu l'abouchement du conduit cystique (4).

D'après Fritsch H, Kühnel W. Atlas de poche d'anatomie 2 : viscères. 4ème édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007, 449 p.

La quantité de **lymphe** produite par le foie est telle que la moitié du contenu du corps en lymphe y est stockée. C'est l'organe qui en produit le plus. De fins canaux dans les espaces portes drainent la lymphe issue des espaces de Disse avant d'émerger au niveau du hile puis dans le canal thoracique.

L'**innervation** est réalisée par des nerfs végétatifs issus du plexus coeliaque, dont les fonctions restent peu connues hormis la vasoconstriction. Les fibres nerveuses se retrouvent associées aux structures des espaces portes.

4. Les cellules hépatiques

Le foie est doté de cellules parenchymateuses, les hépatocytes et de quatre types cellulaires non parenchymateux, lui conférant une hétérogénéité cellulaire (figure 14).

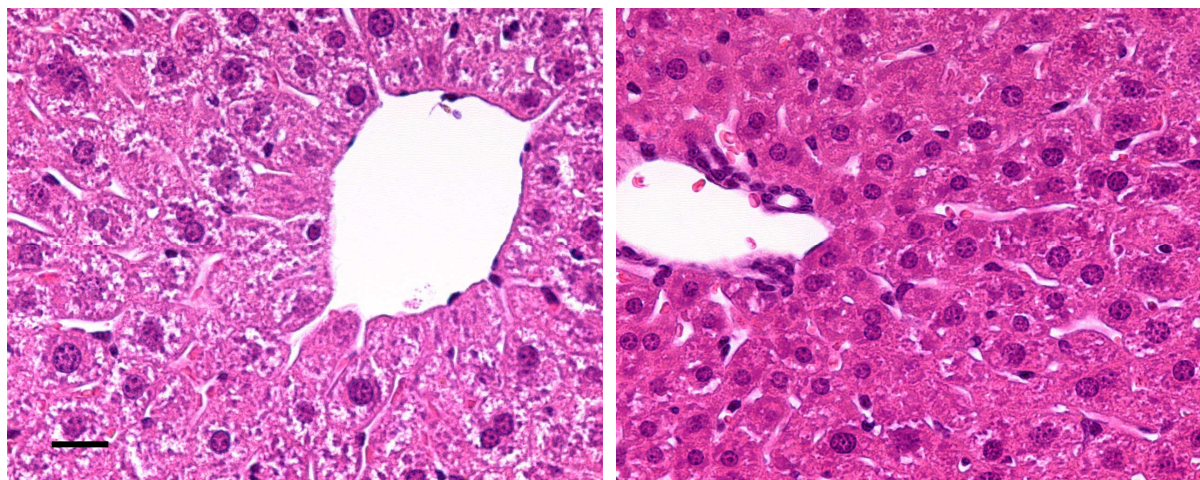


Figure 14. Histologie de foie de souris.

A gauche : veine centro-lobulaire. A droite : espace porte. Barre = 20µm.

a. Les cellules non parenchymateuses

Différents types de cellules hépatiques contribuent à la régulation des fonctions hépatocytaires et réparent les lésions tissulaires (figure 15).

Cellules endothéliales sinusoïdales : ces cellules bordant le sinusoïde forment un endothélium fenêtré car elles présentent des fenêtrés d'un diamètre de 100 nm permettant les échanges de petites molécules entre le sang et les hépatocytes. Une forte activité de pinocytose et d'endocytose est exercée.

Dans l'espace de Disse, se trouvent aux côtés des fibres de collagène, d'autres types de cellules sinusoïdales situées de part et d'autre des cellules endothéliales (figure 15):

Cellules de Küpffer : ces cellules macrophagiques ont un noyau aplati et condensé et un cytoplasme volumineux et peu contrasté mais surchargé de débris pigmentaires phagocytés. Elles font saillie dans la lumière des sinusoïdes. Outre la phagocytose, ces cellules sécrètent des cytokines, des enzymes lysosomiales et génèrent des espèces activées de l'oxygène. Ces cellules sont très actives dans la réponse inflammatoire cellulaire par la présentation des antigènes ou la sécrétion de cytokines.

Cellules étoilées, stellaires ou cellules de Ito : les vacuoles lipidiques du cytoplasme sont riches en vitamine A, 80% de la vitamine A de l'organisme y sont stockés. Ces cellules contribuent au soutien des sinusoïdes mais aussi à leur vasomotricité. La contraction des myofibrilles entraîne une diminution du diamètre des sinusoïdes. Différents constituants de la matrice extracellulaire sont synthétisés par ces cellules.

Grands lymphocytes granulaires ou « pit cells » : ces cellules possèdent une activité « Natural Killer » dans les sinusoïdes, en contact avec les cellules endothéliales et les cellules de Küpffer. Elles sont impliquées dans la défense antivirale et antitumorale.

Les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes : ce sont les cellules cubiques et polarisées qui constituent le canal biliaire. L'ensemble de 3 ou 4 cellules forme un

cholangiole. Elles concourent à la sécrétion de la bile, synthétisée et excrétée par les hépatocytes, en modifiant sa composition, notamment par les transporteurs (AE2, ASBT, CFTR, FIC1, détaillés dans le paragraphe suivant) (D'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.)

b. Les hépatocytes

Les hépatocytes, cellules principales fonctionnelles du foie, représentent 80% du volume du foie soit un nombre d'environ 100 milliards dans un foie humain. Ils sont en lien étroit soit avec les sinusoides permettant des échanges avec le sang par l'espace de Disse et forment à un de leurs pôles avec un hépatocyte adjacent le canalicule biliaire (figure 15).

Les hépatocytes sont de grandes **cellules épithéliales, polyédriques** (20 à 30 µm) **polarisées** au noyau arrondi dont la chromatine est disposée en périphérie et le nucléole bien visible. Le noyau, qui occupe 5 à 10% du volume cellulaire, a une taille variable selon la **ploïdie**, qui augmente avec l'âge. En effet, plus de la moitié des noyaux a pour caractéristique de contenir deux fois le lot normal de chromosomes, ils sont dits tétraploïdes, et nombre de ces cellules contiennent quatre à huit fois le lot de chromosomes (polyploïdes). De plus, 15 à 20% des cellules sont normalement binucléées (contiennent deux noyaux). Dans le foie adulte normal, l'indice mitotique est très faible, inférieur à 1 pour 1000 (D'après Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3^{ème} édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p.).

Métaboliquement actifs, les hépatocytes sont par conséquent riches en organites cytoplasmiques.

Selon l'état nutritionnel du sujet, ils stockent plus ou moins de glycogène et transforment des quantités différentes de lipides, conférant un aspect variable au cytoplasme. Cependant, le cytoplasme est granuleux, éosinophile et notablement pâle, en histologie classique, en raison des granules de glycogène qui y sont stockées à proximité du réticulum lisse.

Ils consomment beaucoup d'énergie ce qui explique la présence de nombreuses mitochondries (plus de 1000 par cellule soit environ 20% du volume cellulaire).

La présence d'un grand nombre de ribosomes libres, de réticulum lisse et réticulum granuleux illustre une forte activité de synthèse protéique (20% du volume cellulaire est occupé par le réticulum endoplasmique).

L'appareil de Golgi situé au voisinage du canalicule biliaire est très développé, les pigments, les lysosomes et peroxysomes abondent.

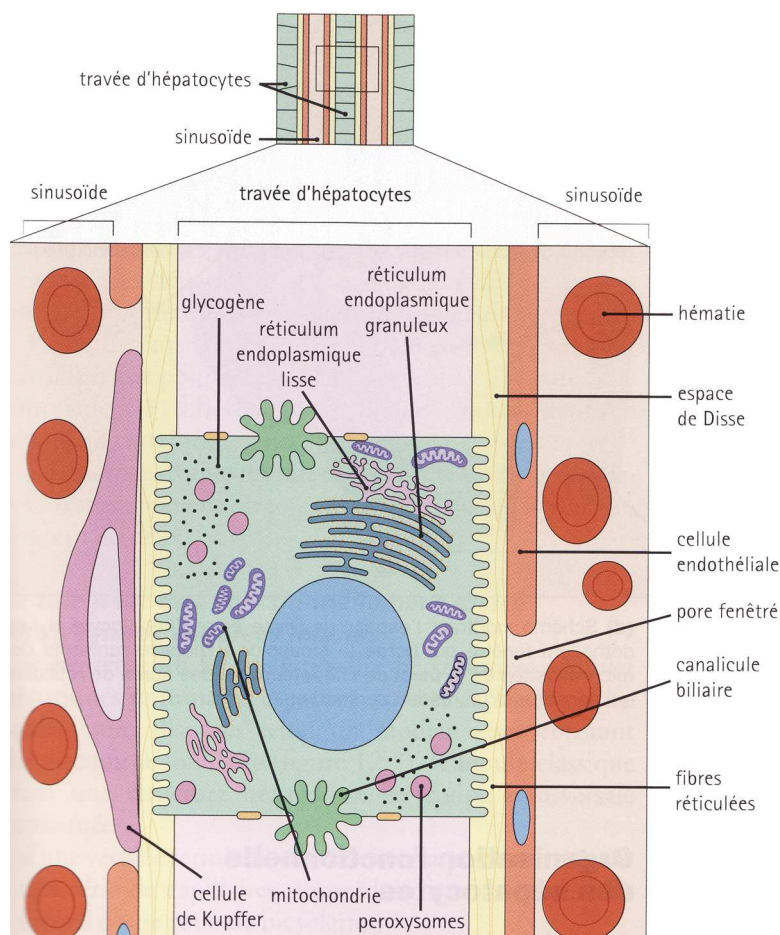


Figure 15. Hépatocyte.

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales. Ils présentent trois types de surfaces, ici deux sont visibles : celle en contact avec le sinusoiide et qui présente des microvillosités et celle qui forme le canalicule biliaire. Chaque hépatocyte contient un réticulum endoplasmique granuleux abondant et un réticulum lisse illustrant la fonction de synthèse protéique de la cellule. Mitochondries et peroxyssomes sont nombreux. Le glycogène est stocké dans le cytosol. L'espace de Disse sépare les hépatocytes de l'endothélium fenêtré des sinusoides. Les cellules macrophagiques de Kùpffer limitent également le sinusoiide.

D'après Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3ème édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p.

Les faces interviennent dans les échanges entre l'hépatocyte, les sinusoides (vaisseaux sanguins) et les canalicules biliaires, ce qui définit trois faces appelées sinusoidales, biliaires et intercellulaires.

Les faces sinusoidales ou pôle sinusoidal, vasculaire ou baso-latéral (70% de la surface) sont au contact de l'endothélium fenêtré des sinusoides et présentent des microvillosités ainsi que quelques fibres de soutien du réseau de réticuline qui pénètrent dans l'espace de Disse. Entre ces microvillosités, des puits recouverts de clathrine s'invaginent pour permettre l'endocytose. Les microvillosités mesurant 0,5 μm de long, elles augmentent ainsi d'un facteur 6 la surface d'échange avec le sang circulant. Les échanges de substances entre les sinusoides et l'hépatocyte se réalisent par cette face.

Les faces biliaires ou pôle biliaire ou apical (15% de la surface) forment le canalicule biliaire où se draine la bile sécrétée à partir de la cellule hépatique. Les canalicules ont un diamètre de 0,5 à 2,5 μm . Ce sont des jonctions serrées qui entourent le canalicule biliaire formé entre deux hépatocytes, par la juxta-position de deux gouttières délimitant un petit tunnel. L'excrétion biliaire est favorisée par l'activité contractile d'un important réseau de filaments d'actine au regard du canalicule biliaire dans les cytoplasmes de deux hépatocytes adjacents.

Les faces intercellulaires ou pôle latéral (15% de la surface) sont les faces apposées entre deux cellules hépatiques reliées par des jonctions communicantes.

Différents profils métaboliques ont été décrits pour les hépatocytes selon leur localisation par rapport aux espaces portes. Cependant, pour résumer, il est à retenir que ces cellules hépatiques synthétisent des lipides, des protéines, des enzymes, des facteurs de coagulation, de l'urée et de l'albumine. Ils métabolisent les médicaments, les toxines, et

autres substances étrangères et enfin ils régulent les concentrations plasmatiques de glucose.

5. Les fonctions hépatiques

Le foie, plus grand organe du métabolisme, est également un organe majeur de la digestion, en formant la bile. Il reçoit toutes les substances absorbées par l'intestin, à part les graisses. Il est à l'origine d'un éventail d'activités métaboliques : transformation et détoxification des glucides, protides, lipides, régulation, synthèses et stockage des nutriments. Son intense activité métabolique en fait une source de chaleur corporelle (d'après Moore KL, Dalley AF. Anatomie médicale. Aspects fondamentaux et applications cliniques. 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck, 2007, 1209p. ; Young B, Lowe J, Stevens A, Heath JW. Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather. 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck, 2008, 437 p. ; Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3^{ème} édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p. ; Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.)

Chez les êtres vivants qui ne s'alimentent pas de façon continue, la tâche primordiale du foie consiste à métaboliser sans interruption les nutriments de manière à fournir à l'organisme un flux constant de matériaux susceptibles d'être transformables en énergie.

Les fonctions biochimiques sont principalement assurées par des cellules épithéliales, les hépatocytes :

Fonction hématopoïétique : Lors de la vie fœtale, le foie ainsi que la rate concourent à la production de cellules sanguines (hématopoïèse) jusqu'au quatrième mois de gestation où l'hématopoïèse médullaire prend progressivement le relais. Les sinusoides comportent des précurseurs sanguins tels des mégacaryocytes, ainsi que des précurseurs érythroïdes et myéloïdes. Aucun tissu hématopoïétique n'est retrouvé dans le foie chez le sujet adulte normal. Toutefois, si la moelle osseuse n'assure plus son rôle à l'âge adulte, en raison d'une fibrose médullaire, d'une tumeur maligne envahissant la moelle osseuse ou d'une hémoglobinopathie, le foie recouvre sa fonction hématopoïétique. Le foie participe à la formation de l'hémoglobine grâce à ses réserves en fer et en vitamine B12.

Métabolisme des lipides : à partir des lipides, le foie est impliqué dans la synthèse du cholestérol, des lipoprotéines plasmatiques et des phospholipides. Son rôle est également d'oxyder les acides gras pour produire de l'énergie.

Métabolisme des glucides : le foie régule la glycémie (taux de glucose dans le sang) par les processus de glycogénèse (stockage du glucose sous forme de glycogène), de glycogénolyse (dégradation du glycogène) et de néoglucogénèse encore appelé gluconéogénèse (synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques). Le maintien de la glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L repose sur le rôle de deux hormones antagonistes sécrétées par les cellules endocrines du pancréas : l'**insuline** (hypoglycémiante) et le **glucagon** (hyperglycémiant). Ces hormones, libérées dans le sang, sont reconnues par des récepteurs spécifiques situés sur la membrane des hépatocytes. Il est également à noter une conversion des glucides et des protéines en acides gras et en triglycérides.

Métabolisme des protéines : le foie assure une importante synthèse des protéines plasmatiques, comme l'albumine, les protéines inflammatoires et de transports et les facteurs de coagulation du sang (fibrinogène et prothrombine). Cette synthèse protéique est assurée par le réticulum endoplasmique granuleux. Le foie métabolise les neuf acides aminés essentiels que l'organisme ne peut synthétiser et qui sont apportés par l'alimentation pour produire les acides aminés non essentiels. En effet, cette synthèse est rendue possible par la composition commune de tous les acides aminés, à savoir, un

squelette carboné (fourni par des intermédiaires du métabolisme tels la glycolyse ou le cycle de Krebs) et deux fonctions, une amine et un acide carboxylique. Enfin, il intervient dans la détoxification des déchets métaboliques, par exemple dans la désamination des acides aminés et la production d'urée à partir de l'ammoniaque circulante.

En présence de syndrome inflammatoire, la sécrétion de protéines est stimulée comme le fibrinogène, la transferrine et la protéine sérique amyloïde A. Inversement, la production de l'albumine est diminuée.

Stockage : le foie stocke le glycogène, les vitamines A, D et B12 ainsi que le fer au sein d'une structure protéique multimérique appelée la ferritine.

La production de la bile : en qualité de glande endocrine la plus volumineuse, le foie produit près d'un litre de bile par jour. Ce liquide verdâtre alcalin, sécrété par les hépatocytes, émulsifie les graisses pour faciliter leur clivage par la lipase. Il contient de l'eau, des électrolytes (Cl^- , HCO_3^- , Na^+ , K^+ , aux concentrations du plasma), des acides biliaires, des phospholipides, du cholestérol, du glutathion et de la bilirubine conjuguée.

Détoxification : le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes, surtout centrolobulaires, et dans une moindre mesure des cellules Küpffer, contient un grand nombre d'enzymes d'hydroxylation comme les cytochromes P450 et de conjugaison qui dégradent ou conjuguent les substances étrangères à l'organisme nommées **xénobiotiques** (médicaments, polluants et toxiques comme l'alcool...). Ces enzymes appelées **EMX** sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Les xénobiotiques, de nature lipophile, doivent être transformés en composés **hydrophiles** afin d'accroître leur solubilité, facilitant leur élimination dans la bile et/ou dans les urines (figure 16).

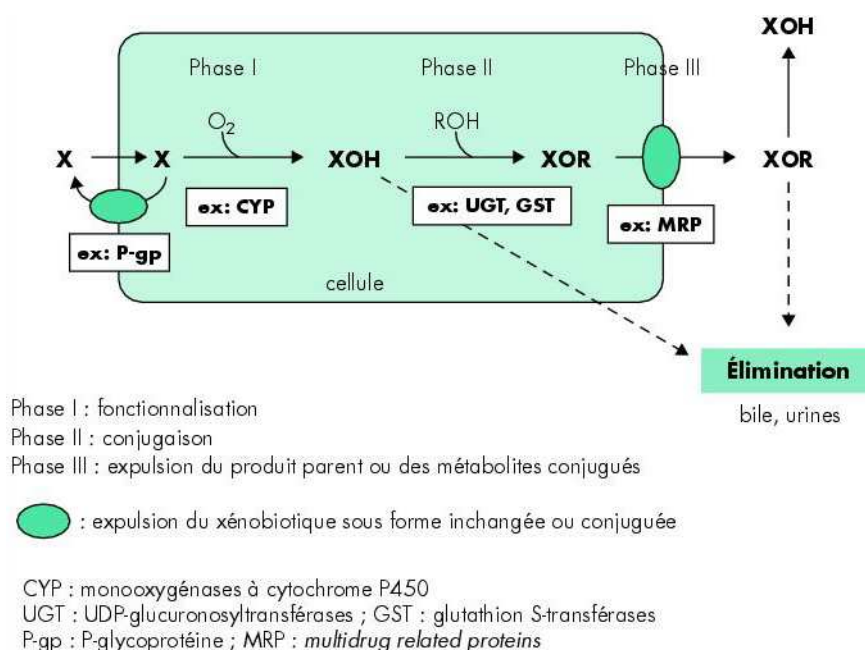


Figure 16. Détoxification des xénobiotiques.

Généralement hydrophobes, les xénobiotiques (X) rentrent facilement dans la cellule de manière passive ou à l'aide de transporteurs membranaires. Ils peuvent en être expulsés par des protéines comme la P-gp ou être métabolisés par fonctionnalisation (phase I, exemple : les cytochromes P450) et/ou par conjugaison (phase II, exemple : les glutathion-S-transférases), en produits plus hydrophiles (XOH et XOR), ce qui facilite leur élimination hors de la cellule. L'élimination est directe ou effectuée par l'intermédiaire de protéines dites de phase III, comme les MRP (Multidrug Resistance Proteins) (Lecomte, 2006)

Après une première étape qui consiste à franchir la barrière intestinale pour pénétrer dans le compartiment vasculaire, les différentes étapes du métabolisme sont ensuite principalement hépatiques et divisées en deux groupes : les réactions de phase I et de phase II. Cependant, les xénobiotiques ne seront pas métabolisés si les transporteurs, tels la P-glycoprotéine P-gp, les expulsent de l'hépatocyte sous forme inchangée (Lecomte, 2006). La manière dont les cellules métabolisent les xénobiotiques est souvent décrite en trois phases de détoxifications (Ishikawa, 1992).

Les réactions de **phase I** sont des réactions de **fonctionnalisation** catalysées majoritairement par les enzymes de la **superfamille des monooxygénases à cytochrome P450 (CYP)** qui vont catalyser des réactions d'**oxydation**. Parmi les autres enzymes de phase I, on peut citer des **déshydrogénases**, des **réductases** et des **hydrolases**. La finalité des réactions de phase I est de rendre plus **polaires** les molécules sur lesquelles pourra s'exercer une seconde biotransformation (Crettol et al, 2009).

Les réactions de **phase II** sont pour la plupart des réactions de **conjugaison** qui rendent les métabolites produits par les réactions de phase I encore plus hydrophiles. Parmi les enzymes des réactions de phase II, on retrouve les **N-acétyltransférases (NAT)**, les **glutathions S-transférases (GST)**, les **sulfo-transférases (SULT)**, les **Epoxydes Hydrolases (EH)**, les **Méthyl Transférases** ainsi que les **UDP-glucuronosyltransférases (UGT)**. Les thiopurines méthyltransférases métabolisent des molécules anticancéreuses comme la thiopurine dont l'administration comporte de graves risques pour les métaboliseurs lents et rapides. C'est pourquoi, il s'avère nécessaire d'établir le phénotype du sujet avant traitement afin d'adapter la dose (Brierley & Burchell, 1993; Brix et al, 1998; Coughtrie et al, 1998; Crettol et al, 2009; Hayes & Pulford, 1995; Mannervik & Danielson, 1988)

L'un des exemples de la prédisposition génétique liée au polymorphisme des gènes de phase II concerne le **cancer du foie**. Une association a pu être mise en évidence entre le risque de carcinome hépatocellulaire et certains polymorphismes du gène **UGT 1A7**. Un des variants est retrouvé chez 75% des patients, alors qu'il n'est présent que chez 22% des témoins. L'activité enzymatique de l'enzyme codée par l'allèle variant est déficiente. L'UGT 1A7 normale n'étant pas exprimée dans le foie mais dans les épithéliums oro-pharyngés et pulmonaires, elle jouerait un rôle de détoxification des carcinogènes inhalés (Sheweita & Tilmisany, 2003).

La **phase III** a pour but d'éliminer hors de la cellule les métabolites conjugués qui doivent être transportés à travers la membrane par des **protéines de transport ATP dépendantes** appartenant à la famille des transporteurs membranaires **ABC** (ATP-binding cassette) comme la P-gp codée par le gène MDR1 (MultiDrug Resistance 1) ou les **pompes GSX** pour les conjugués au glutathion (Yamazaki et al, 1996).

En cas d'échec du métabolisme des xénobiotiques, ces derniers peuvent entraîner des effets toxiques, des mutations voire une initialisation tumorale à cause de leurs interactions avec les molécules biologiques (lipides, acides nucléiques, protéines). Cependant, les étapes de biotransformation que les CYP assurent peuvent être à l'origine d'un **métabolite électrophile**. Ce métabolite réactif pourra ainsi créer des mutations en interagissant avec l'ADN. Certains **procarcinogènes** (inactifs initialement), tels l'aflatoxine B1, le benzo[a]pyrène et le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) peuvent devenir des **carcinogènes** (actifs) par la bioactivation des CYP. Ces carcinogènes actifs provoquent des mutations de l'ADN qui sont normalement corrigées par les enzymes de réparation. Toutefois, ces mutations peuvent engendrer une initiation tumorale si les enzymes effectuent une réparation inadéquate de l'ADN (« mismatch ») ou si ces enzymes ne peuvent corriger un nombre trop grand de mutations. Outre la biotransformation en métabolites électrophiles, l'étape d'oxydation

des xénobiotiques peut également produire des **espèces réactives de l'oxygène** (ERO) habituellement transformées par les enzymes antioxydantes et/ou neutralisées par des molécules antioxydantes. Si les processus d'élimination sont dépassés, un grand nombre d'altérations peut apparaître en raison de leur liaison aux molécules biologiques. Par conséquent, les réactions ne parvenant pas à la détoxification conduisent à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose ou peuvent induire une initiation tumorale. De même pour les médicaments, la détoxification peut entraîner une toxicité importante ou l'échec d'une thérapie.

Certaines protéines enzymatiques et de transport appartiennent à la même classe fonctionnelle correspondant à des superfamilles (exemples : les **CYP**, les **NAT**) comprenant de nombreuses isoformes qui sont les produits d'expression de gènes distincts mais qui possèdent de fortes homologues dans leurs séquences en acides aminés. Au sein d'une même superfamille, les isoformes ont une spécificité de substrat relative et chevauchante. L'expression ou l'activité des protéines impliquées dans le transport, le métabolisme et la pharmacodynamie des médicaments varient en fonction de facteurs physiopathologiques, environnementaux et génétiques (polymorphismes génétiques). Ces variations peuvent avoir des répercussions significatives sur l'effet des médicaments (efficacité et/ou tolérance).

Le choix de détailler les enzymes appelées cytochromes P450 se justifie par les orientations scientifiques de la thèse. En effet, nous avons choisi de surexprimer le CYP2E1 dans les cellules HepaRG (cf. chapitre Résultats 1).

Les cytochromes P450 constituent un système de défense de l'organisme présent dans tous les organismes vivants de la bactérie à l'homme, apparus très tôt il y a 1,4 milliards d'années à partir d'un gène ancestral. Plus de cent gènes apparentés de cytochromes seraient dénombrés chez l'Homme, certains étant des pseudogènes, pour lesquels il n'a pas été trouvé de produit de gène fonctionnel. Ces apoprotéines ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique contiennent une molécule d'hème (figure 17).

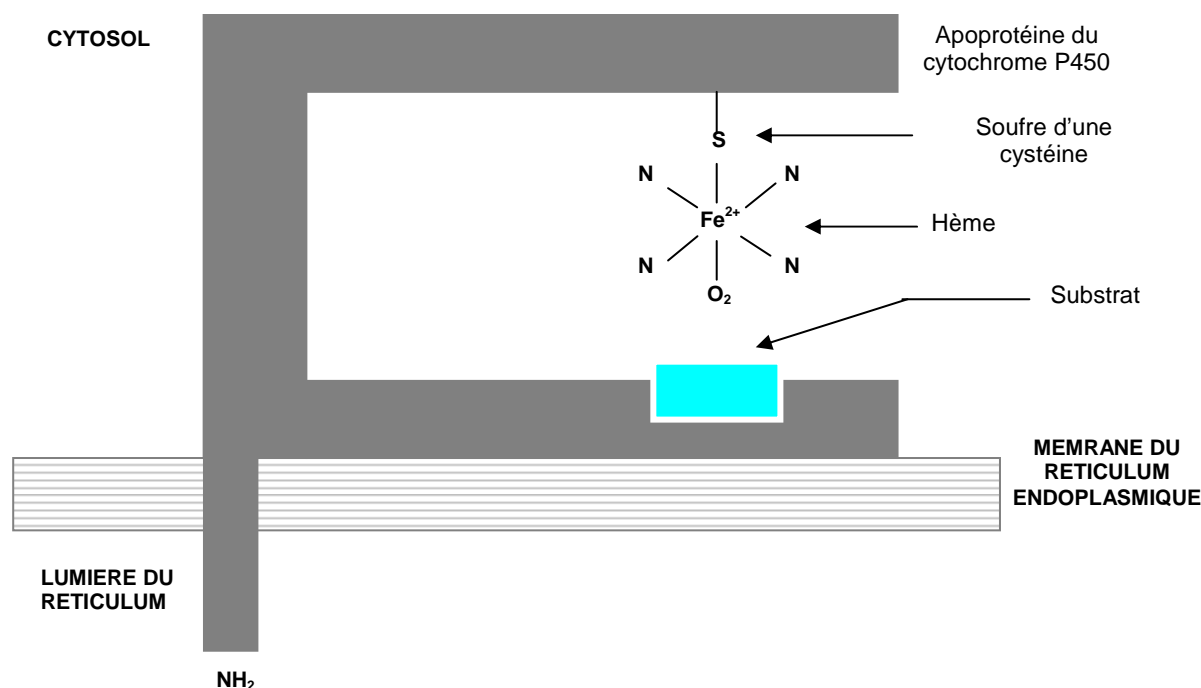


Figure 17. Structure schématique du cytochrome P450. Le cytochrome est une hémoprotéine constituée d'une apoprotéine et d'un noyau hème accroché par le groupement SH. Le résidu NH_2 est inséré dans la membrane plasmique du réticulum endoplasmique.

Dans la réaction type (figure 18), le cytochrome P450 transforme un substrat hydrophobe (RH) en produit hydrophile (R-OH) souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle (-OH). Pour cela, il utilise une molécule d'oxygène O₂, d'un proton (H⁺) et de deux électrons (apportés par le NADPH ou accessoirement le NADH). La flavoprotéine **NADPH cytochrome P450 réductase** catalyse le transfert d'électrons du NADPH vers le fer du noyau hème du cytochrome, lors de cette oxydation (Shakunthala, 2010).

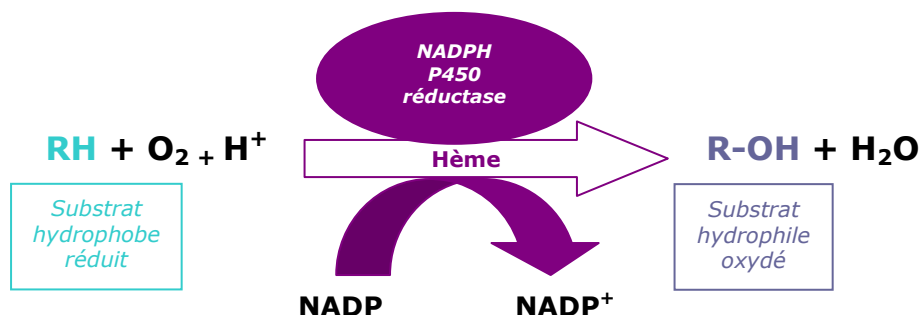


Figure 18. Mode d'action de l'enzyme NADPH P450 réductase.

La superfamille des **cytochromes CYP P450 humaines** se compose de quelques 57 enzymes CYP réparties en quatre familles principales dont trois jouent un rôle majeur dans le métabolisme des drogues, dénommées **CYP 1, 2 et 3**. Quant au **CYP 4**, il ne métabolise pas de xénobiotiques mais est inducible par ces derniers (exemple : fibrates, dérivés du plastique), en revanche, il métabolise l'acide arachidonique et les acides gras. Chaque famille se décline en sous-famille indiquée par une lettre (exemple : CYP3A) et pouvant être codée par plusieurs gènes. Six chromosomes humains portent des gènes codant les cytochromes P450.

La famille CYP 3A, en l'occurrence la sous-famille **CYP 3A4**, est largement majoritaire tant pour son implication dans le métabolisme des drogues (figure 19) que pour la quantité retrouvée dans le foie (figure 20). Associé au **CYP 2D6**, ces deux cytochromes métabolisent environ **80% des médicaments (50% par CYP 3A4 et 30% par CYP 2D6)** bien qu'ils ne représentent qu'un tiers des cytochromes hépatiques (30% pour CYP 3A4 et 2% pour CYP 2D6). Paradoxalement, le CYP2D6 compte pour une très faible part du total du contenu des cytochromes P450 dans le foie, mais il est responsable du métabolisme d'un grand nombre de drogues (Shimada et al, 1994). Le CYP 2D6 présente la plus grande variabilité dans l'activité métabolique en raison d'un polymorphisme génétique. Les individus sont porteurs d'une activité CYP 2D6 normale, nulle ou intermédiaire, car le CYP 2D6 n'est pas toujours présent dans le foie. L'incidence des métaboliseurs lents pour ce cytochrome varie entre les populations et représente 10% pour la population caucasienne, 18% pour la population africaine et 100% pour les Esquimaux. Le cytochrome **2C** fait référence aux **CYP 2C9** et **CYP 2C19**. L'expression du CYP2C19 montre également un polymorphisme génétique, avec approximativement 3 à 5% de Caucasiens et 15 à 20% de populations asiatiques ayant un métabolisme lent ou sans fonction CYP2C19. Le **CYP 2E1**, qui ne représente que 7% des CYP hépatiques, est inducible (intoxication alcoolique, obésité, diabète, stéatose non alcoolique). Ce CYP métabolise à la fois des molécules exogènes (éthanol, chlorzoxazone, paracétamol, acide salicylique, halothane, tétrachlorométhane, nitrosamine, molécules procarcinogènes) et des molécules endogènes (acétone, acide arachidonique et autres acides gras).

Une quantité conséquente (1/3) de cytochromes P450 n'a pas encore été caractérisée, (figure 20) cependant la plupart des cytochromes P450 majoritaires l'est désormais ainsi que leurs substrats et inducteurs (figure 21). La liste des composés métabolisés par la superfamille des CYP P450 figure en annexe 1.

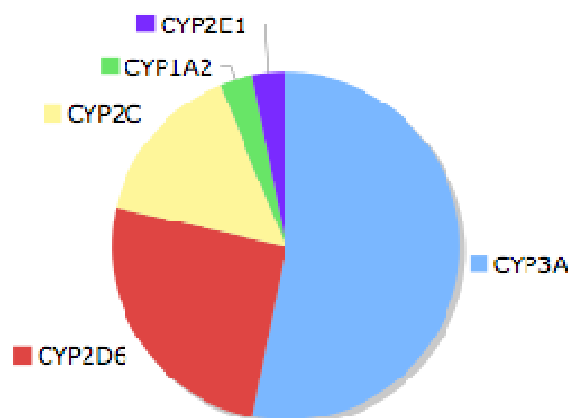


Figure 19. Importance relative des cytochromes P450 dans le métabolisme des drogues.

Le graphe liste les isoformes majoritaires de la superfamille des CYP 450 et leurs rôles relatifs dans le métabolisme des drogues (et non pas les quantités relatives trouvées dans le foie) basés sur le nombre de drogues connues pour être métabolisées par un isoenzyme particulier. CYP 3A est responsable du métabolisme du plus grand nombre de drogues, suivi du CYP 2D6.

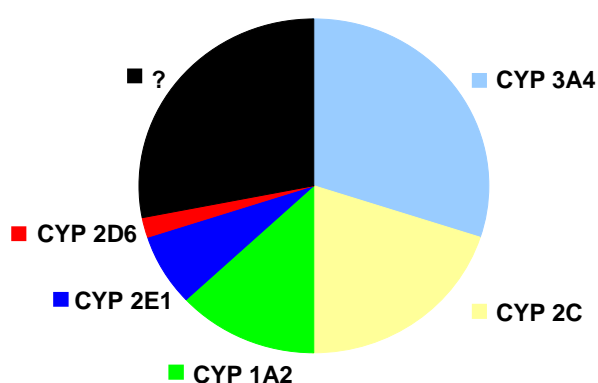


Figure 20. Quantités relatives des cytochromes P450 dans le foie.

Le graphe résume les quantités relatives des cytochromes P450 retrouvées dans le foie. Le CYP 3A4 est toujours majoritaire (30%) suivi du CYP 2C (20%), du CYP 1A2 (13%), du CYP 2E1 (7%) et enfin du CYP 2D6 (2%). Un dernier tiers reste inconnu.

Figures 17 et 18 (Shimada et al, 1994)

Drogues métabolisées par les cytochromes				
3A4	2C	1A2	2E1	2D6
Atorvastatine Antimycotiques azalés Anticalciques Carbamazépine Codéine Corticoïdes Cyclosporine A Diazépam Ethinylestradiol Lovastatine Midazolam Méthadone Inhibiteurs de la protéase du VIH Simvastatine Tacrolimus	Proguanil Glibenclamide Losartan Citalopram Oméprazole Moclobémide Diazépam Fluvastatine Irbesartan Tolbutamide Phénytoïne	Théophylline	Anesthésiques par inhalation Paracétamol Chlorzoxazone (myorelaxant), Molécules carcinogènes Alcools Chloroforme Halothane	Maprotiline Propafénone Bêtabloquants Antidépresseurs tricycliques Codéine Fluoxétine Parotexine Risperidone

Figure 21. Principales drogues métabolisées par les cytochromes. Liste non exhaustive.

Pour assurer les processus de la phase III de la détoxification, les hépatocytes et les canalicules biliaires comportent un grand nombre de **transporteurs** notamment dans le but de former la bile (figure 22). Cette sécrétion repose sur deux mécanismes : la sécrétion active des acides biliaires dans les canalicules d'une part et la sécrétion active de composés tels que le glutathion ou l' HCO_3^- d'autre part. L'étude du métabolisme des drogues sous l'angle des transporteurs dans le foie a fait l'objet d'une revue récente par Hagenbuch (Hagenbuch, 2010).

Après capture des acides biliaires au niveau de la membrane sinusoidale par les transporteurs NTCP et OATP, ils diffusent jusqu'au pôle biliaire dans le cytoplasme sous une forme liée à diverses protéines. Leur sécrétion active dans le canalicule est permise par le transporteur BSEP (ATP dépendant).

Différents composés sont par ailleurs transportés dans le canalicule biliaire : le glutathion qui emprunte le même transporteur que la bilirubine (MRP2), l' HCO_3^- (échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ appelé AE2), le cholestérol (ABCG5/8), les phospholipides tels la phosphatidyl choline (MDR3), les cations organiques (MDR1), le cuivre (ATP7B). Quant au transporteur FIC1, il pourrait transférer les aminophospholipides tels la phosphatidyl éthanolamine et la phosphatidyl sérine.

Enfin, les cellules du canal biliaire modifient la bile par quatre transporteurs. FIC1 et AE2, décrits précédemment, sont retrouvés à ce niveau. Le canal chlore CFTR permet à l'épithélium biliaire de sécréter une solution riche en HCO_3^- . Une réabsorption des acides biliaires peut avoir lieu dans les canaux biliaires par le transporteur ASBT (d'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.)

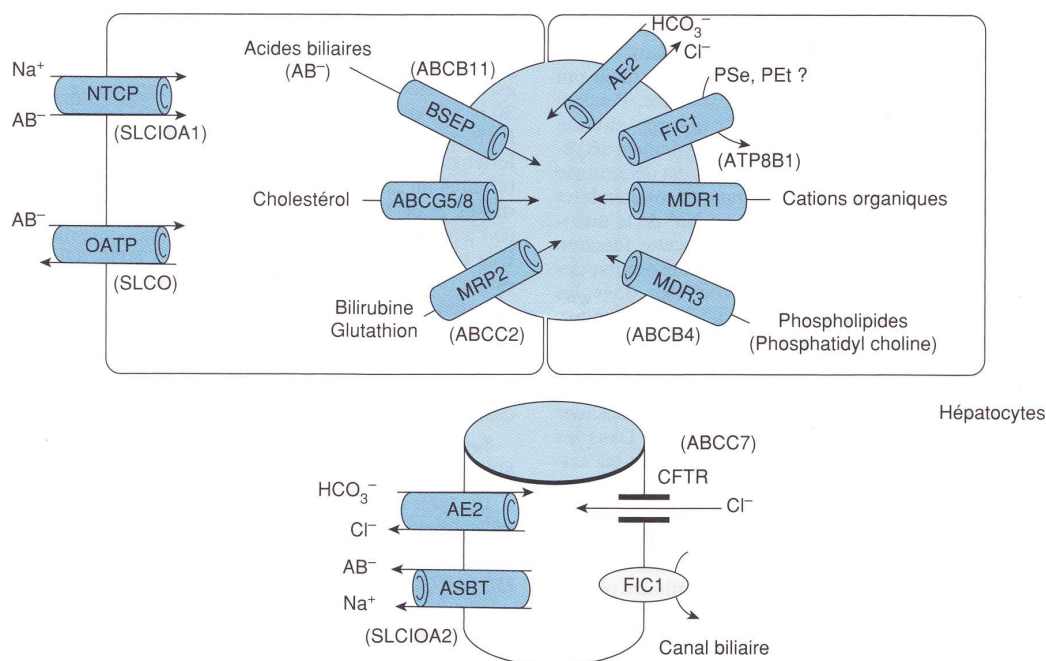


Figure 22. Principaux transporteurs hépatocytaires et cholangiocytaires.

Transporteurs canaliculaires : BSEP, bile salt export pump ; MRP2, multi-drug related protein 2 ; FIC1, familial intrahepatic cholestasis 1 ; MDR1 et MDR3, multi-drug resistant protein 1 et 3 ; AE2, anion exchanger 2. **Transporteurs sinusoidaux** : NTCP, Na-taurocholate co-transporting polypeptide ; OATP, organic anion transporting polypeptide. **Transporteurs cholangiocytaires** : AE2, anion exchanger 2 ; ASBT, apical sodium-dependent bile salt transporter ; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; FIC1, familial intrahepatic cholestasis 1. PSe : phosphatidyl sérine ; PEt : phosphatidyl éthanolamine.

D'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.

Dans des situations pathologiques ou en présence de toxiques, le niveau d'expression des transporteurs (figure 23) peut être modifié aboutissant à des changements de capacités métaboliques, d'influx et/ou d'efflux de composés potentiellement toxiques pour les cellules (Klaassen & Aleksunes, 2010).

Basolateral Uptake Transporters						
	Ntcp	Oatp1a1	Oatp1a4	Oatp1b2	Oat3	Oct1
Acetaminophen	↓	↓	↑	↓		
Carbon tetrachloride	↓	↔	↑↓	↓	↓	↓
α-Naphthylisothiocyanate	↓	↓	↔	↓		
Lipopolysaccharide	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Bile duct ligation	↓	↓	↑	↓	↔	↓
Partial hepatectomy	↓↔	↓↔	↓↑	↓		
Ischemia-reperfusion	↓	↓	↓	↓		

Basolateral Efflux Transporters						
	Mrp1	Mrp3	Mrp4	Mrp5	Mrp6	Ostβ
Acetaminophen	↑	↑	↑			
Carbon tetrachloride	↑	↔	↑		↓	
α-Naphthylisothiocyanate		↑	↔			↑
Lipopolysaccharide	↑	↑	↔	↔	↓	
Bile duct ligation	↑	↑	↑	↑	↔	↑
Partial hepatectomy	↑	↑↔	↑↔		↓↔	↑
Ischemia-reperfusion	↔	↔	↔			

Canalicular Efflux Transporters						
	Mrp2	Mdr1a	Mdr1b	Mdr2	Bsep	Bcrp
Acetaminophen	↑	↑	↑	↔	↓	↑↔
Carbon tetrachloride	↓↑	↑	↑	↑	↔	
α-Naphthylisothiocyanate	↑			↑	↑	↔
Lipopolysaccharide	↓	↓↔	↑	↔	↓	
Bile duct ligation	↑↓↔	↑	↑	↑	↑↔	
Partial hepatectomy	↑↓↔	↑↔	↑↔	↑	↑↓↔	↔
Ischemia-reperfusion	↓		↑		↓	

Figure 23. Régulation pathophysiologique des transporteurs hépatiques.

L'expression des ARNm ou des protéines hépatiques des transporteurs d'influx et d'efflux chez le rongeur est augmentée, diminuée, et/ou inchangée en réponse à divers toxiques et conditions pathologiques (Klaassen & Aleksunes, 2010).

6. La régénération hépatique

De façon finaliste, il est considéré que la régénération du foie protège les organismes des pertes tissulaires hépatiques causées par l'ingestion de toxines. Les processus sont connus par les scientifiques depuis de nombreuses années et même depuis l'Antiquité. Le **mythe de Prométhée** laisse supposer que les Grecs anciens avaient découvert que le foie est l'un des rares organes humains à se régénérer spontanément en cas de lésion. Ayant volé le secret du feu divin pour le donner aux hommes, Prométhée s'est attiré la colère de Zeus. Par vengeance, Zeus fit enchaîner Prométhée, nu, sur le mont Caucase pour y avoir chaque jour le foie dévoré par un aigle. Il n'y avait pas de terme à sa souffrance, car toutes les nuits son foie se reconstituait.

a. Equilibre de la masse hépatique

La stabilité fonctionnelle du foie se caractérise par de faibles taux de mort et de prolifération cellulaires assurant un renouvellement tissulaire lent mais continu du foie.

Un contrôle très précis s'exerce entre la **prolifération/différenciation** et la **mort cellulaire**, qui, en cas de nécessité, offre la possibilité aux hépatocytes différenciés quiescents d'intervenir dans la régénération du foie afin de pallier des insuffisances hépatiques.

L'une des premières descriptions scientifiques du phénomène de régénération est la publication par **Higgins** en **1931** décrivant la **régénération du foie** de rat après hépatectomie des 2/3.

Le retour à la masse initiale du foie est mis en œuvre par un processus qui porte le nom exact d'**hyperplasie compensatoire** et non de **régénération hépatique**, qui correspond à un abus de langage.

Les premiers travaux sur la régénération émanent de **N. Bucher** (Nature, 1970).

Dans le foie normal, cet équilibre permet à la masse hépatique de rester constante et de répondre aux besoins métaboliques de l'organisme (figure 24).

Lors de lésions hépatiques induites par des agressions virales et/ou xénobiotiques, une mort cellulaire importante réduit la masse du foie, engendrant une insuffisance métabolique. Des signaux de résistance à la mort cellulaire et de prolifération des cellules hépatiques sont induits pour limiter la perte tissulaire dans le but de régénérer le foie et de rétablir la capacité métabolique. A l'inverse, une prolifération cellulaire anormale provoque une hépatomégalie, contre laquelle d'autres facteurs seront recrutés pour créer une réduction tissulaire par apoptose (Fausto, John Libbey Eurotext, 1992).

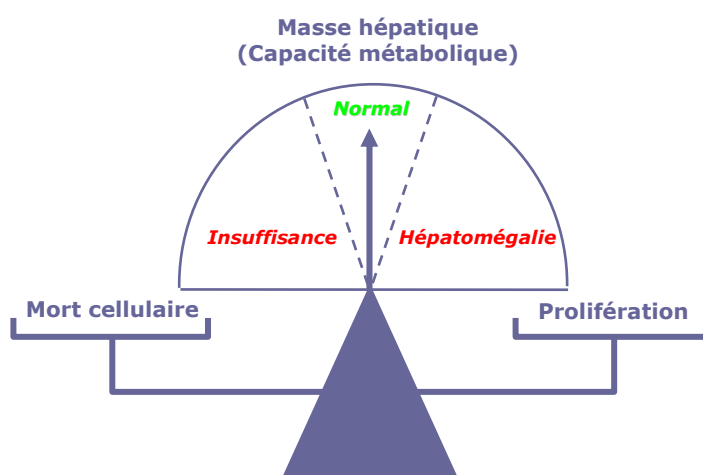


Figure 24. L'équilibre mort cellulaire/prolifération.

La régénération hépatique se poursuit et s'arrête lorsque la masse et le volume du nouveau foie sont identiques au foie initial, avant la destruction hépatique, illustrant la « dépendance à l'organisme » (Van Thiel et al, 1987). L'adaptation de la taille du foie à son environnement est un mécanisme extrêmement contrôlé, harmonieux et progressivement amorti.

En cas d'hypertrophie (hépatomégalie), qui est beaucoup plus rare que l'insuffisance hépatique, les mécanismes d'apoptose se mettent en place afin de rétablir la masse et le volume initiaux.

Ces régulations médiées par les processus d'apoptose ou d'induction de la prolifération s'appliquent lors des transplantations hépatiques et par conséquent, élargissent les possibilités de transplanter des greffons, en l'occurrence des greffons d'une taille supérieure ou inférieure à la taille du foie du receveur (Francavilla et al, 1994).

Afin de souligner l'**unicité** de ce phénomène cellulaire, il est intéressant de revenir sur le renouvellement cellulaire des autres organes tels la peau, l'intestin ou le sang. Leurs mécanismes de réparation font intervenir des **cellules souches tissulaires**, leurs cellules différenciées étant programmées demeurer quiescentes ou pour mourir.

b. Efficacité de la régénération hépatique

Les cellules hépatiques ont une durée de vie de 300 à 500 jours, dans un foie au repos. Les rares divisions des cellules voisines permettent de remplacer les hépatocytes qui disparaissent, à raison d'1 division pour 10 000 cellules. En réponse à une perte tissulaire, suite à des agressions constantes par des agents toxiques et pathogènes, le foie peut initialiser un puissant processus de régénération. La majorité des pathologies du foie entraînent des lésions tissulaires, dont l'évolution et le pronostic seront conditionnés par sa capacité régénérative. Toutefois, si 75% de la masse du foie est réséquée chirurgicalement (hépatectomie), une restitution complète du poids du foie est observée en huit semaines chez le chien, trois semaines chez le rat et quatre semaines chez l'homme. Chez l'homme, trois semaines suffisent à compenser une hépatectomie partielle des 2/3 d'un foie, 7 à 10 jours pour le rat (Grisham, 1962). Après hépatectomie, chaque hépatocyte peut se diviser une à deux fois (en moyenne 1,6 cycles de réplication) expliquant la récupération de la masse hépatique. Cette capacité de régénération est itérative car elle perdure après plusieurs résections successives. (Simpson & Finckh, 1963).

Cette régénération anatomique est également fonctionnelle. Elle est une réponse rapide permettant de faire face à une insuffisance hépatique aigüe, de guérir les nécroses hépatiques, et autorisant les exérèses chirurgicales les plus étendues. En clinique, si la régénération ne peut s'initialiser, la situation est extrêmement critique.

Seul le foie est doué d'une telle capacité de régénération, les potentialités de prolifération cellulaire du foie sont tout aussi importantes que celles des cancers les plus malins et la croissance fœtale, bien que ces situations soient peu comparables. Les tissus comme le tissu hématopoïétique, les cellules germinales, l'épithélium intestinal ou la peau, susceptibles de renouvellement cellulaire, sont aussi efficaces, mais à la différence du foie, ne s'effectuent pas à partir d'un compartiment différencié.

c. Les mécanismes de la régénération hépatique

Dans le foie, les hépatocytes, qui sont des cellules très **différenciées** et **quiescentes** bloquées au **stade G0**, répondent à un signal en entrant dans le **cycle cellulaire**. Leur **potentiel prolifératif** est conservé même après une longue période quiescente (Fausto et al, 2006).

Néanmoins, les progéniteurs ou cellules souches hépatiques appelés **cellules ovales** ou « liver progenitor cells » (LPC), situées entre la travée d'hépatocytes et le canalicule biliaire (Fausto, 2004; Kung & Forbes, 2009) peuvent être recrutées pour prendre le relais de la repopulation du foie si les hépatocytes sont dans l'incapacité de proliférer, en raison d'une lésion massive ou chronique du foie (figure 25).

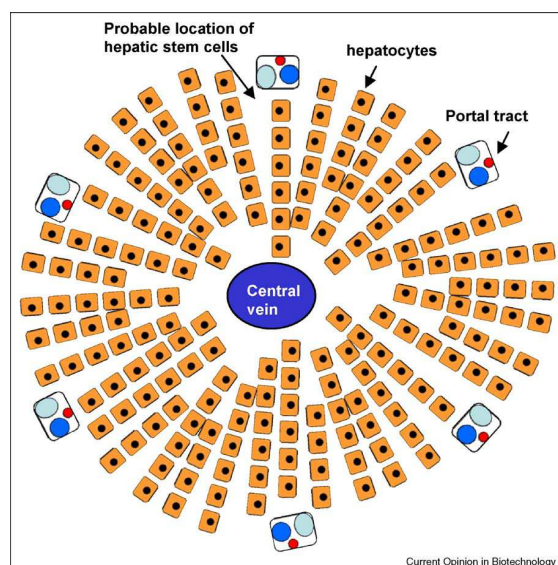


Figure 25. Localisation des LPC.

Les cellules progénitrices du foie (LPC) semblent localisées dans les branches terminales de l'arbre biliaire, zone appelée Canal de Hering. Ces LPC sont activées pour proliférer dans des lésions hépatiques sévères ou chroniques, lorsque la prolifération par les hépatocytes est compromise. Les cellules sont bipotentes et peuvent donner à la fois des hépatocytes et des cellules épithéliales biliaires. Les hépatocytes situés dans l'aire portale sont moins prolifératifs que ceux situés à proximité de la veine centrale. (Kung & Forbes, 2009)

Cette alternative a été notamment démontrée chez les rongeurs après exposition à un mutagène hépatotoxique, la rétrorsine (Gordon et al, 2000). Les deux processus de réparation sont distincts mais peuvent être observés simultanément dans certains modèles de lésions (Rosenberg et al, 2000; Wang et al, 2003). Néanmoins, l'analyse ontologique des gènes montre que la restauration après hépatectomie et lors du développement du foie diffèrent de façon significative en regardant les facteurs de transcription et la modification de la structure de la chromatine (Otu et al, 2007).

La liste des modèles et des hépatotoxines les plus fréquemment utilisés pour l'étude de la régénération médiée par les LPC (figure 26) a été actualisée dans la revue de Dollé (Dollé 2010).

Nature of the regime	Rodent model
Phenobarbital	Mouse
AAF/PH	Mouse and rat
AAF/CCl ₄	Rat
AAF/AA	Rat
CD/AAF	Rat
CDE	Rat and mouse
DDC	Mouse and rat
DIPIN + PH	Mouse and rat
D-Galactosamine + PH	Rat and mouse
Lasiocarpine + PH	Rat
Retrorsine + PH	Rat
Retrorsine + CCl ₄	Rat
Retrorsine + allyl alcohol	
APAP	Mouse
AA	Rat and mouse
CCl ₄	Mouse
DEN	Rat and mouse
Long-term ethanol	Rat and mouse

Figure 26. Modèles expérimentaux couramment utilisés pour la régénération médiée par les LPC.

Seules les publications représentatives sont listées. Les hépatotoxines les plus fréquemment utilisées sont indiquées en gras. AAF, 2-Acetyl-amino-fluorene; APAP, N-acetyl-p-aminophenol; AA, allyl alcohol; PH, partial hepatectomy; CCl₄, carbone tetra-chloride; CDE, choline-déficient, ethionine-supplémented diet; DDC, 3-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; DIPIN, 1,4-bis[N,N0-di(ethylene)phosphamide]piperazine; DEN.V, diethylnitrosamine (Dolle et al, 2009).

Ce contrôle précis du volume hépatique implique des mécanismes de régulation mettant en jeu plusieurs voies de signalisation, afin que la taille du foie s'adapte à son hôte et à ses besoins métaboliques. Afin d'induire la régénération hépatique, plusieurs facteurs impliqués dans ce processus ont été identifiés, comme l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), le TGF- α (Transforming Growth Factor- α).

A l'inverse, les dosages des ALAT, ASAT, TNF- α , IL-1 β , et des caspases 3 et 12 témoignent des processus de nécrose et apoptose.

Les signaux moléculaires de la régénération à partir des hépatocytes matures (figures 27, 28 et 29) sont désormais bien compris (Michalopoulos, 2007; Michalopoulos & DeFrances, 1997).

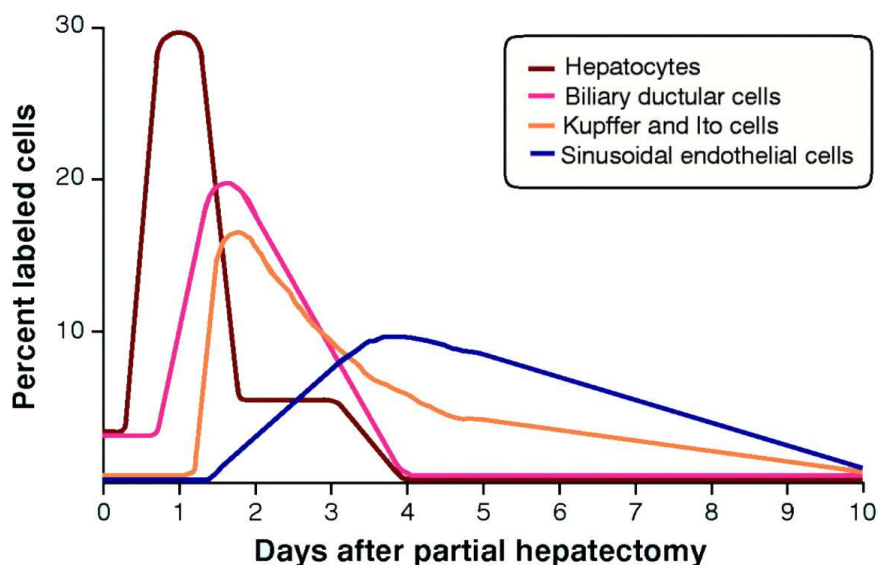


Figure 27. Cinétique de régénération hépatique. Courbes de synthèse d'ADN de l'ensemble des cellules hépatiques chez le rat après hépatectomie partielle. (Michalopoulos & DeFrances, 1997).

Suite à une hépatectomie partielle des 2/3, chez le rat qui est le modèle le plus classique, deux vagues de régénération sont observées au cours du temps (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Un **premier pic étroit** implique seulement les **hépatocytes** qui entrent très rapidement en phase de synthèse d'ADN pour compenser la perte tissulaire, et cela de façon **synchrone**. Les hépatocytes quittent les premiers l'état de quiescence pour entrer dans le cycle cellulaire dans les **30 minutes** pour atteindre un **pic de synthèse d'ADN à 24 heures**. La phase G1 survient dans les 18h post-hépatectomie, la phase S entre 18h et 36h et la phase G2/M entre 24h et 26h. Il existe une notion de gradient porto-cave car les hépatocytes se divisent d'abord au niveau des espaces portes puis des zones péri-portales.

Une deuxième vague impliquant toutes les cellules non parenchymateuses apparaît sous la forme de pics plus tardifs et plus larges indiquant une initialisation plus lente et un processus plus long. Les cellules biliaires, puis les cellules de Kupffer et de Ito et enfin les cellules endothéliales s'engagent donc en phase S à partir de 48 heures après l'hépatectomie.

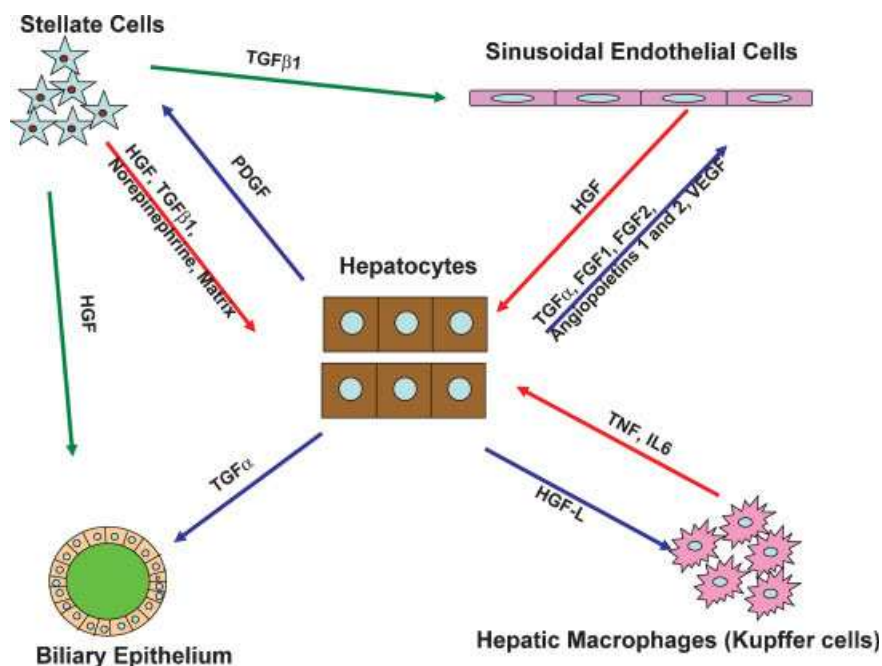


Figure 28. Interactions entre différents types cellulaires hépatiques impliqués dans la régénération hépatique.
(Michalopoulos, 2007)

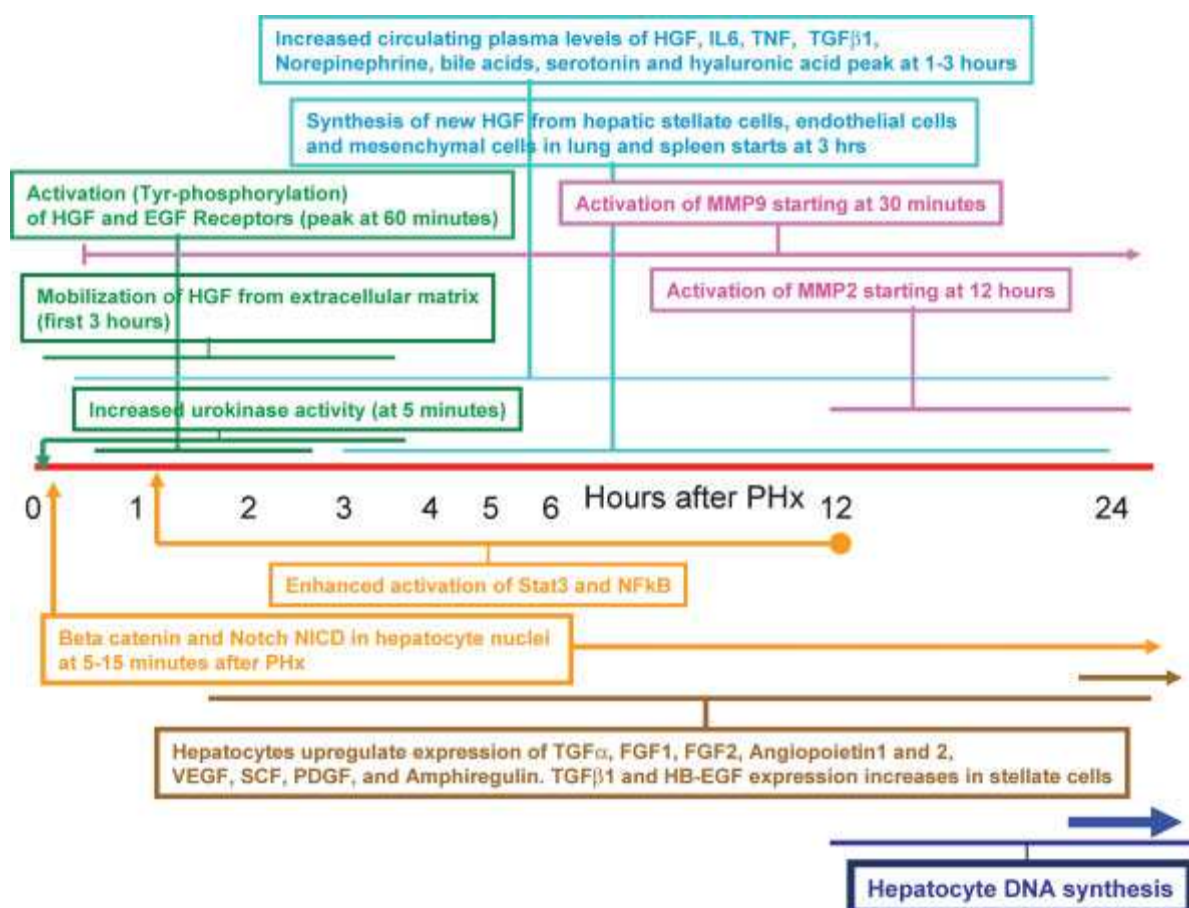


Figure 29. Chronologie des événements clés arrivant aux stades précoces de la régénération hépatique après hépatectomie partielle. Les événements écrits dans les boîtes colorées correspondent à la même catégorie (vert : événements liés à des facteurs de croissance ; bleu : changements liés au plasma, etc.). Les lignes horizontales pour chaque boîte délimitent le commencement et la durée de chaque signal (Michalopoulos, 2007).

La lésion hépatique cause des changements significatifs dans l'expression et l'activité d'une variété de signaux produits par les cellules hépatiques, les glandes endocrines et les plaquettes. Ces molécules incluent les composants C3 et C5 du complément, des cytokines (TNF- α et interleukines), des facteurs de croissance (TGF α , epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF, FGF, insulin-like growth factor (IGF)-I, and HGF)), la matrice extra-cellulaire, des protéases extracellulaires et des inhibiteurs de protéases, des hormones (insuline, growth hormone (GH), thyroid hormone, vasopressin, prostanoids, et endothelin-1) et des neurotransmetteurs (sérotonine), des métabolites (acides biliaires, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), NO, des lipides, du glutathion, de la S-adenosylmethionine, et du sphingosine-1-phosphate), et des chimiokines. La progression de la régénération du foie est donc coordonnée par un ensemble de signaux de communication entre les hépatocytes et les cellules non parenchymateuses, et est ainsi influencée par les glandes endocrines, l'innervation sympathique et la circulation sanguine (Michalopoulos, 2007; Michalopoulos, 2010)

La régénération hépatique (figure 30), par la prolifération des hépatocytes quiescents, répond à un signal régénératif et se déroule en trois phases (Taub, 2004).

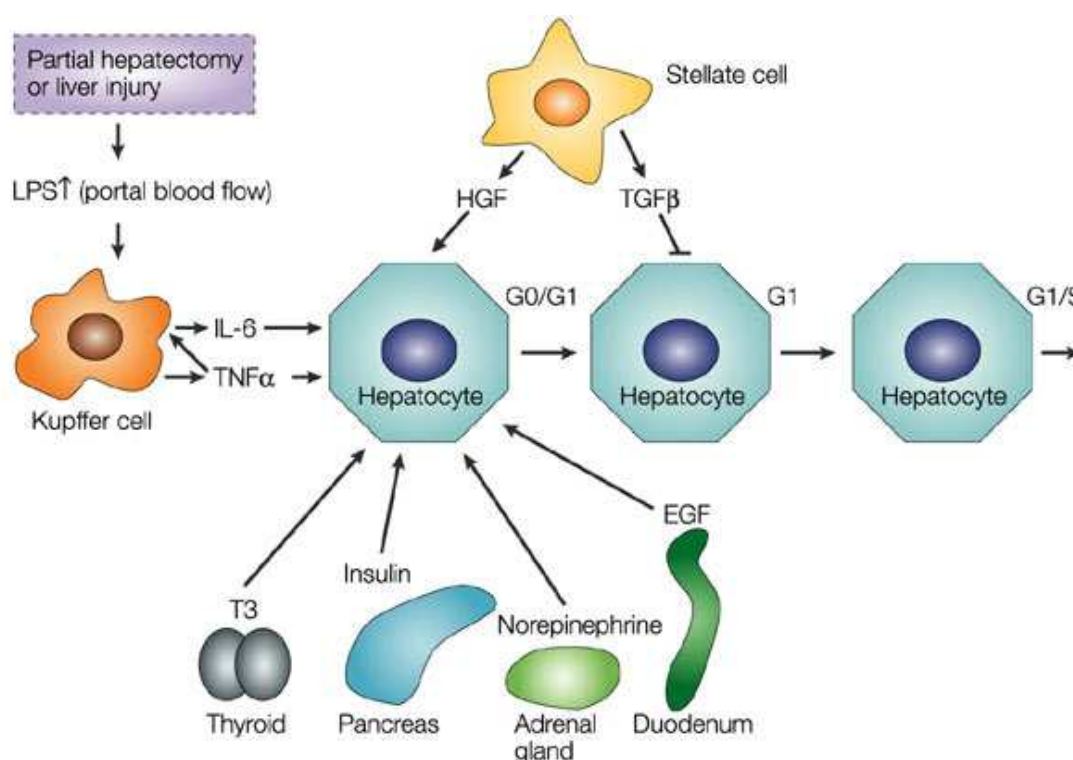


Figure 30. Etapes de la régénération hépatique. Principaux facteurs de la régénération hépatique et leurs origines (Taub, 2004).

La **phase d'initiation** ou **priming** correspond à la sortie de la phase G0 (quiescence) et à l'entrée des hépatocytes dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire (figure 35). L'hépatectomie ou la lésion du foie induit une augmentation du **LPS** (LipoPolySaccharide) présent dans le sang de la veine porte, ce qui active la sécrétion de **cytokines pro-inflammatoires**, dont les plus importantes sont le **TNF- α** (Tumor Necrosis Factor-alpha) et l'**IL-6** (Interleukin-6) sécrétés par les cellules de Küpffer. Ces deux cytokines vont activer la synthèse de molécules de la phase aiguë de l'inflammation. De nombreux gènes sont activés aussitôt après l'hépatectomie, en partie sous l'effet des cytokines, constituant les *immediate early genes* qui codent pour des facteurs de transcription, et qui vont jouer un rôle essentiel dans les mécanismes de survie anti-apoptotique d'une part et l'induction de la prolifération d'autre part. Outre le **TNF- α** et l'**IL-6**, il faut souligner le rôle de la **sérotonine**, libérée par les plaquettes, dans l'initiation de la régénération. Il a récemment été montré chez des souris atteintes de thrombocytopénie

ou ayant une activité plaquettaire altérée que cette phase d'initiation de la régénération était en échec en raison d'un manque de sérotonine provenant des plaquettes (Lesurtel et al, 2006).

Deux facteurs de transcription majeurs sont activés, **NF- κ B** (Nuclear Factor for the kappa chain of B cells) et **STAT-3** (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). Leur activation permet de préparer les hépatocytes à la réplication. **NF- κ B** et **STAT-3** induisent des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2) et anti-oxydants (iNOS, inducible Nitric Oxide Synthetase), des proto-oncogènes (c-fos, c-jun, jun B et c-myc) et agissent sur des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire (cyclines et leurs kinases associées CDK, Cyclin Dependant Kinases).

Le remodelage de la matrice extra-cellulaire (MEC) joue un rôle important dans la régénération hépatique par l'activité protéolytique des protéases telles les métalloprotéases matricielles (MMP) qui vont dégrader la MEC. Le **TNF- α** induit le remodelage de la MEC par induction de la MMP-9, qui elle-même contrôle l'induction de gènes du cycle cellulaire tel que CDK1 par un mécanisme encore inconnu, ce qui permet la synthèse d'ADN (Serandour et al, 2005). Il est important de mettre l'accent sur la notion de **réponse au stress** ainsi que sur la notion d'acquisition de la **sensibilité aux facteurs de croissance** mise en évidence **in vivo** (Webber et al, 1994) et **in vitro** (Loyer et al, 1996).

En utilisant des cultures primaires d'hépatocytes, le rôle du facteur de croissance EGF (epidermal growth factor) a fait l'objet d'études pendant l'entrée et la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. La stimulation permanente à l'EGF induit la synthèse d'ADN dans la plupart des hépatocytes de rat en culture primaire. L'expression des marqueurs du cycle cellulaire a été étudiée. Il a été montré que la transition G0/G1 survient lors de l'isolement des hépatocytes, comme en atteste l'expression des gènes précoces tels c-fos, c-jun et c-myc. En culture, les hépatocytes progressent en G1 sans tenir compte de la stimulation des facteurs de croissance jusqu'à un point de restriction PR au milieu de la phase G1 au-delà duquel ils ne peuvent compléter le cycle cellulaire sans stimulation mitogénique (Loyer et al, 1996; Serandour et al, 2005).

Les données sur la phase d'initiation ont fait l'objet d'une récente revue de Michalopoulos (Michalopoulos, 2010) comme l'illustre la figure 31.

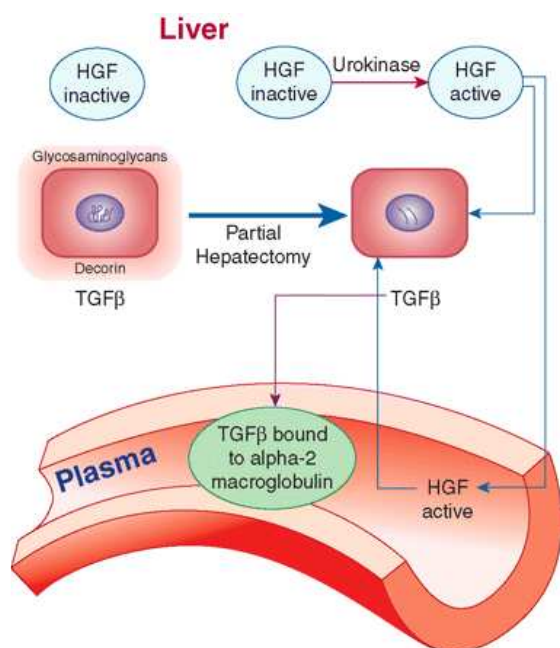


Figure 31. Interaction entre HGF et TGF β 1 pendant l'initiation de la régénération hépatique. L'HGF est un mitogène pour les hépatocytes, tandis que le TGF β 1 est connu comme inhibiteur de la mitose. L'HGF se lie aux glycosaminoglycans et le TGF β 1 à la decorine, deux des molécules présentes dans la matrice pérircellulaire entourant les hépatocytes. Après hépatectomie partielle, l'activation de l'urokinase provoque le remodelage et la dégradation de la matrice pérircellulaire. L'HGF est ensuite relargué et activé par l'urokinase, où il peut exercer son effet mitogénique sur les hépatocytes. Les concentrations de l'HGF et du TGF β 1 augmentent rapidement dans le plasma après l'hépatectomie partielle. Tandis que l'HGF exerce ses effets sur les hépatocytes du plasma, le TGF β 1 est neutralisé par la liaison à l' α -2 macroglobuline. Le penchement de la balance entre HGF et TGF β 1 aux étapes les plus précoces de la régénération du foie est un composant clé des stimuli précoces induisant la prolifération des hépatocytes (Michalopoulos, 2010).

La **phase de prolifération** aboutit à l'entrée en phase S puis à la mitose des hépatocytes. Cette phase nécessite l'activation de gènes dits *delayed early genes* et *late genes* permettant de franchir la transition G1/S. Le principal facteur de croissance est l'**HGF** (Hepatocyte Growth Factor). Il est sécrété par les cellules étoilées et a une action paracrine. D'autres facteurs de croissance sont libérés comme le **TGF- α** (Transforming Growth Factor) par les hépatocytes, l'**EGF** (Epidermal Growth Factor) par les glandes salivaires et le duodénum. Ces stimuli ont pour principales actions l'activation de la voie de signalisation MEK/ERK aux 2/3 de la phase G1, l'induction de la cycline D1 (Loyer et al, 1996; Talarmin et al, 1999), et le franchissement du point de restriction dépendant des mitogènes. D'autres facteurs **co-mitogènes** entrent aussi en jeu comme l'**insuline** (pancréas), la **noradrénaline** ou **norépinéphrine** (glandes surrénales) et la thiodothronine **T3** (thyroïde).

La **phase d'arrêt de prolifération** ou **phase de terminaison** est la dernière étape, caractérisée en résumé par l'inactivation de l'**HGF** et déclenchée par la libération de membres de la famille du **TGF- β** (Transforming Growth Factor) comme le **TGF- β 1**, l'**activine A** et l'**IL-1 β** (Interleukin-1 β). Le **TGF- β** inhibe la synthèse d'ADN de l'hépatocyte (figure 32).

Cette étape reste mal définie notamment autour de la question du déclenchement des agents inhibiteurs ou la cessation des substances stimulantes qui finalement stoppe la régénération (Rychtrmoc et al, 2009). Aux participations des sous-populations cellulaires hépatiques et le remodelage de la matrice extracellulaire, s'ajoutent les cellules non parenchymateuses qui médient l'inhibition de la croissance de novo pendant la réorganisation structurelle du foie, après restauration du volume du foie. La réapparition de la matrice extracellulaire pourrait jouer un rôle dans la liaison renouvelée au pro-HGF (Fausto, 1991).

Les facteurs ayant des effets d'inhibition connus sur la prolifération des hépatocytes dans les cultures tels que **TGF- β 1** (synthétisé in vivo normalement par les cellules de Ito) ont fait l'objet de recherches (Thenappan et al, 2009; Zimmermann, 2004). Des observations suggèrent que la disparition du TGF- β 1 tissulaire de la région périportale à péricentrale du lobule permet la progression de la vague de mitoses dans la même direction en début de régénération. Le TGF- β 1 relargué rapidement après hépatectomie partielle est probablement inactif par la liaison à l' α -2 macroglobuline. Les hépatocytes eux-mêmes sont transitoirement résistants aux effets d'inhibition de la mitose de TGF- β 1 pendant la phase proliférative. Après cette période réfractaire, TGF- β 1 pourrait jouer un rôle dans la finalisation de la régénération. Les membres de la famille TGF β , comme l'**activine**, agissent de même (Clavien et al, 2007). Parallèlement à ces signaux extracellulaires, une nouvelle voie de signalisation dépendante de protéines kinases, la **voie Hippo/YAP**, semble réguler de façon négative la croissance cellulaire. Plusieurs études récentes suggèrent que cette voie participe au contrôle de la masse hépatique et à l'arrêt de prolifération post-hépatectomie.

De nombreuses boucles de feed back interviennent pour la terminaison (Michalopoulos, 2007) :

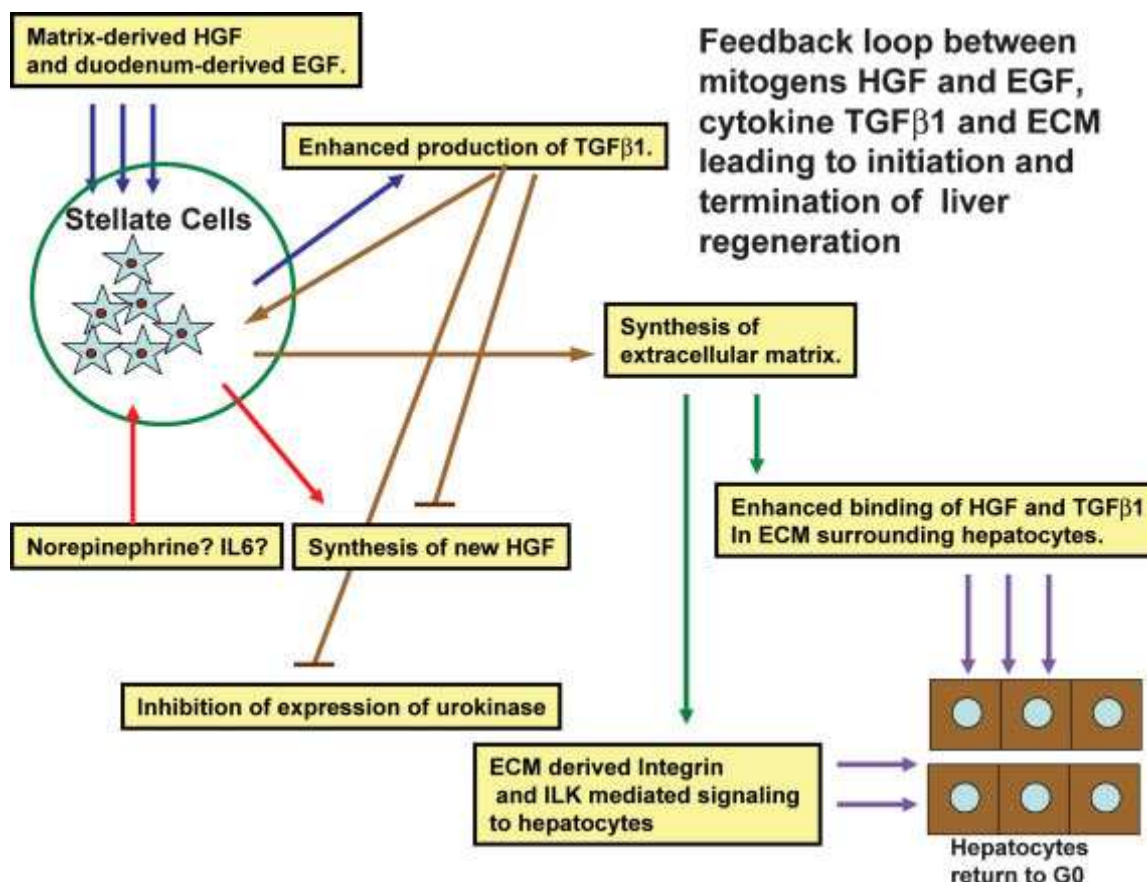


Figure 32. Schéma des boucles de feedback entre les facteurs de croissance TGFβ1, et la matrice extracellulaire, contrôlant les stades précoces et tardifs de la régénération. Les mitogènes (HGF et EGF) augmentent l'expression de TGFβ1 par les cellules étoilées. Ce dernier stimule la synthèse de nouvelle matrice extracellulaire, bloquant finalement la nouvelle synthèse de HGF et l'expression d'urokinase. La matrice extracellulaire nouvellement synthétisée soutient la liaison des chaînes simples d'HGF et TGFβ1 autour des hépatocytes et la restauration de la phase de quiescence (G0). Les flèches de même couleur indiquent une origine similaire des entrées et des sorties des mêmes processus de signalisation (Michalopoulos, 2007).

Les revues de Clavien (figure 33) et de Zheng (Zheng et al, 2009) actualisent le réseau des molécules signal qui médient la communication des cellules hépatiques dans la régulation de la régénération du foie.

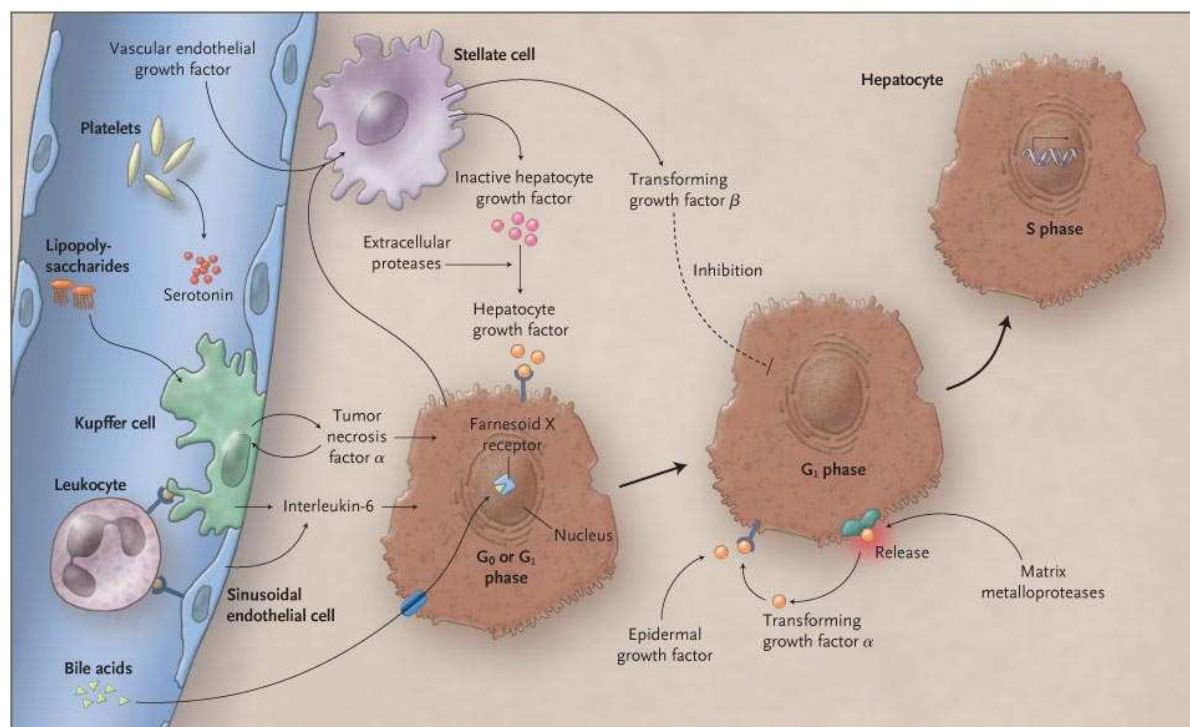


Figure 33. Voies de régénération hépatique suite à une hépatectomie.

Après hépatectomie, les cellules non parenchymateuses, telles que les cellules étoilées, les cellules de Kupffer, les leucocytes et les plaquettes sont activés par des facteurs solubles, comme le **VEGF** (vascular endothelial growth factor) et le **LPS** (lipopolysaccharide). L'interaction entre les composants vasculaires actifs, incluant les plaquettes, leucocytes, les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules de Kupffer, résulte du relargage du **TNF- α** (tumor necrosis factor- α), l'interleukine-6 (**IL-6**), et de la **sérotonine**. Les cytokines sont à l'origine de l'initialisation des hépatocytes quiescents et de façon concurrente, les **protéases extracellulaires**, comme l'urokinase-type plasminogen activator, convertissent la forme inactive de l'**HGF** (hepatocyte growth factor) en forme active. L'inactif HGF, qui est sécrété par les cellules étoilées, est un mitogène qui induit la prolifération des hépatocytes. Les métalloprotéases de la matrice (**matrix metalloproteases**) convertissent le **TGF- α** (transforming growth factor- α) lié à la membrane sous une forme soluble. Dans une boucle autocrine, le **TGF- α** , avec l'EGF (endothelial growth factor), active le récepteur de l'EGF (endothelial growth factor receptor). Les cytokines et les facteurs de croissance agissent de concert pour initialiser l'entrée des hépatocytes quiescents (phase G0) dans le cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S phase, aboutissant à la synthèse d'ADN et à la prolifération des hépatocytes. Pour indiquer la fin de la prolifération, le **TGF- β** (transforming growth factor- β) bloque les réplifications suivantes. La conséquence métabolique résultant de la perte d'hépatocytes se traduit par l'accumulation d'acides biliaires dans le sang. Les acides biliaires entrent dans les hépatocytes jusqu'aux récepteurs des acides biliaires, tel le récepteur farnesoid X, résultant d'une synthèse d'ADN et protéique augmentée (Clavien et al, 2007).

Pour résumer, les deux voies de régénération hépatique à partir des hépatocytes matures et des cellules ovals sont présentées ci-dessous (Dolle et al, 2009), figure 34 :

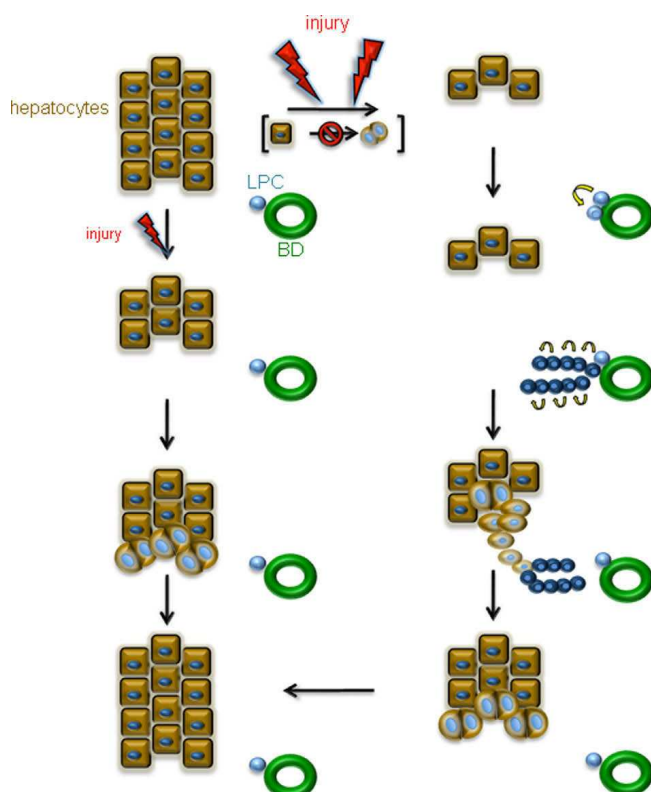


Figure 34. Représentation schématisée des deux voies de régénération impliquées dans la réparation du foie. Normalement, la régénération du foie est menée intégralement par le compartiment des hépatocytes différenciés (côté gauche). Après une courte période, les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses ont restauré la masse et les fonctions hépatiques. Quand les hépatocytes ne sont pas compétents, bloqués ou que la croissance est dépassée par une lésion sévère (côté droit), le compartiment des cellules progénitrices du foie (LPC) (bleu clair) va prendre le relais. Une fois actives, ces cellules prolifèrent (flèches jaunes) pour donner des cellules bipotentes ou cellules ovals et leurs cellules filles (bleu foncé). Dans les rongeurs, ces cellules ovals émergent d'une zone périportale (proche des canalicules biliaires, BD), donnant naissance à des cordons de cellules ovals qui infiltrent le foie, et qui se différencient ensuite en hépatocytes et cholangiocytes pour restaurer le foie (Dolle et al, 2009).

d. Régulation particulière du cycle cellulaire

Sous l'angle du cycle cellulaire, les modèles de prolifération d'hépatocytes adultes, in vivo lors de la régénération du foie ou in vitro en cultures primaires, constituent des systèmes particulièrement intéressants puisqu'ils présentent une synchronie « naturelle ». En effet, les cellules progressent de façon relativement synchrone dans le cycle cellulaire en particulier entre la quiescence et la phase S, autorisant des études d'expression et d'activation de gènes et de protéines au cours du franchissement des différentes phases du cycle.

Les étapes du cycle cellulaire ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule : la synthèse de l'ADN et la division cellulaire ou mitose. Le cycle cellulaire est composé de cinq phases successives : G0, G1, S, G2 et M. G signifie gap, S synthèse et M mitose (figure 35).

Hunt et Nurse ont été distingués par le Prix Nobel en 2001 pour l'identification des composantes moléculaires de la minuterie qui contrôlent le cycle cellulaire (Annexe 13). Hartwell a découvert le concept et l'identification des systèmes de point de vérifications ou checkpoints.

La **phase G1** est caractérisée par une synthèse protéique intense associée à un grossissement du cytoplasme. Lorsque les conditions d'environnement sont favorables, la cellule franchit un point de restriction (PR) (Pardee, 1974) et va suivre les étapes successives conduisant à sa division. Avant le PR, les cellules ont besoin des facteurs de croissance, après le PR ils n'en ont plus besoin. Cette phase est la plus variable dans la durée. Certaines cellules en G1, lorsqu'elles n'ont pas franchi le PR, peuvent s'arrêter dans leur progression dans le cycle et entrer en quiescence (G0). Elles peuvent y rester

des jours voire des années. C'est au cours de la phase G1 que les cellules sont sensibles aux stimuli extracellulaires comme les mitogènes et les facteurs de croissance.

La **phase S** est la phase de duplication de l'ADN sous l'action d'ADN polymérases. Sa durée, de 6h à 8h, est constante. Au cours de la phase S, la cellule double son contenu en ADN.

La **phase G2** commence lorsque la duplication de l'ADN est achevée et se caractérise par une synthèse protéique intense nécessaire à la mitose. La cellule contrôle l'intégrité de son génome et la fidélité de la réplication de l'ADN. Un deuxième point de restriction en G2 permet le blocage de la progression dans le cycle en cas de lésions de l'ADN ou d'erreurs de réplication, permettant l'intervention des mécanismes de réparation ou d'orienter les cellules les plus lésées vers l'apoptose.

La **phase M** conduit à scinder la cellule en deux cellules filles. Un nouveau point de contrôle s'assure du bon alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique et d'une ségrégation correcte des composants nucléaires et cytoplasmiques.

Pour chaque phase, il existe une régulation par les kinases dépendantes des cyclines appelées CDK (**sous-unités catalytiques**) au nombre d'une vingtaine (Malumbres et al, 2009). Les **CDK**, sont activées par des **cyclines** particulières, A, B, C, D, E ou encore L (**sous-unités régulatrices**) qui sont codées par plus d'une trentaine de gènes. La formation et l'activation de ces **complexes CDK/cyclines** successifs permettent la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

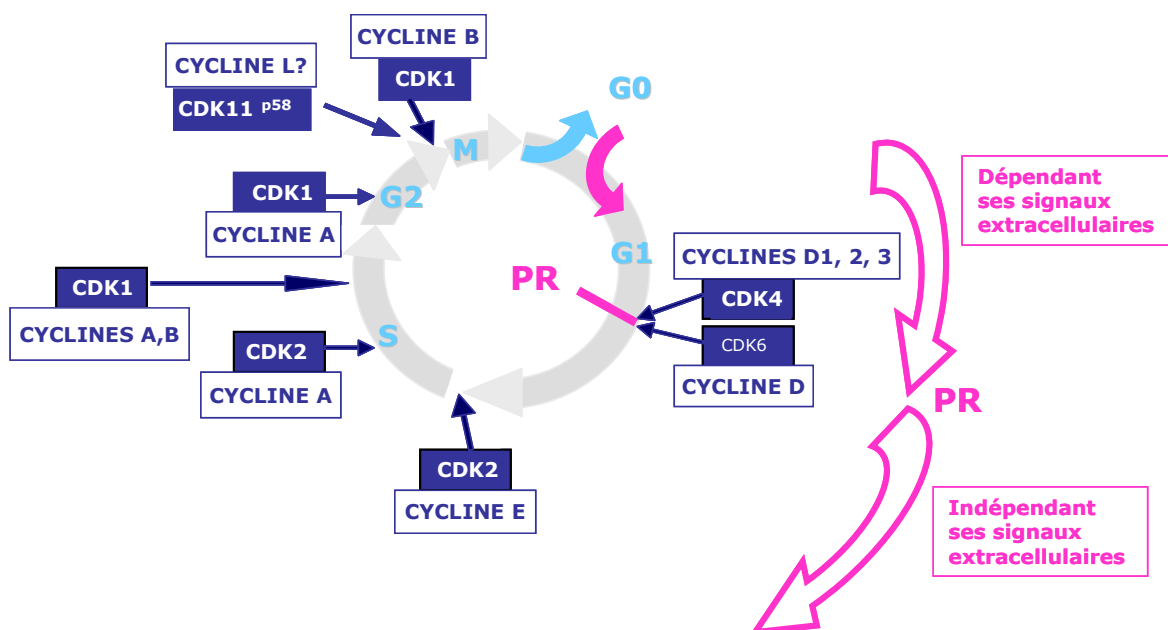


Figure 35. Régulation du cycle cellulaire.

Au cours de la phase G1, les cyclines D1, D2, D3 peuvent se coupler avec la Cdk4 et dans une moindre mesure avec la Cdk6. Ces complexes phosphorylent la partie C-terminale de la protéine du rétinoblastome (Rb) présente en permanence dans les cellules normales mais dont l'état de phosphorylation varie au cours du cycle. Cela conduit à un changement de conformation de Rb et à un déplacement des histones déacetylases (HDAC), ce qui lève la répression de la transcription, permettant l'expression de la cycline E. La cycline E néo-transcrite active la Cdk2, qui phosphoryle la partie centrale de Rb. Le facteur de transcription E2F est alors libéré et active la transcription des gènes cibles nécessaires au déroulement de la phase S. Le point de restriction marque un point de non retour entre le caractère dépendant des signaux extracellulaires

tels HGF, EGF et les MAPK (MEK1, MEK2, ERK1, ERK2) à un caractère indépendant vis-à-vis des signaux (Talarmin et al, 1999).

La cycline A, synthétisée pendant la phase S, active la Cdk2. Elle va phosphoryler E2F qui va perdre son affinité pour l'ADN et ainsi son activité. Deux protéines de la famille Rb inhibent l'activité kinase en se liant à la cycline A. Concernant l'hépatocyte, son originalité est l'expression et le rôle de Cdk1 en phase S (Garnier et al, 2009), alors que Cdk1 est considéré comme mitotique dans la majorité des cellules.

Au cours de la phase G2, la cycline A active Cdk1 puis la liaison B-Cdk1 (appelée M-phase promoting factor ou MPF) va être responsable du passage à la phase M conjointement avec un autre complexe récemment identifié, le complexe CDK11^{p58}/Cycline L (Hu et al, 2007; Loyer et al, 2008; Petretti et al, 2006).

II. Le Carcinome Hépato-Cellulaire

1. Les cancers

Plus de 200 cancers distincts sont dénombrés à ce jour. L'incidence des cancers en Europe est en constante augmentation en raison du vieillissement de la population et de l'amélioration des programmes de dépistage. Le rapport des Académies de médecine et de pharmacie et du Centre International de Recherche sur le Cancer estime à 28% la part de la mortalité par cancer due au tabac et à l'alcool (<http://www.academie-medecine.fr/>). En 2006, 3,2 millions nouveaux cas de cancers ont été recensés (2,9 millions en 2004) et 1,7 millions de décès par cancer (Ferlay et al, 2007). La mortalité par cancer représente toujours la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés, tandis qu'en France, le cancer est devenu récemment la première cause devant les maladies cardio-vasculaires avec 153 000 décès/an entre 2003 et 2005. La survie relative à 5 ans est de 52%, tous cancers confondus avec une disparité liée au sexe, 63% chez la femme et 44% chez l'homme en raison de l'effet du tabac (Rapport de l'Inca, 2007).

De nombreux progrès dans le dépistage et le traitement sont attendus notamment pour le cancer du foie pour lequel seulement 8% d'amélioration du taux de survie sont observés contrairement aux 84% pour le cancer du sein, 77% pour la prostate ou 54% pour le cancer colorectal (Innovation Santé 2015 – LEEM Recherche). L'enjeu majeur est d'œuvrer à la mise en place de nouveaux traitements.

2. Les pathologies du foie

Avant d'approfondir le cancer primitif du foie, appelé Carcinome Hépato-Cellulaire (CHC), il semble intéressant de rappeler les pathologies les plus fréquemment rencontrées en hépatologie comme le précise le tableau (figure 36).

Le tableau présente les maladies les plus fréquentes en France, qui reflètent les données des pays d'Europe occidentale et d'Amérique. Cependant, les chiffres diffèrent beaucoup d'un pays à l'autre. La cirrhose est moins présente dans les pays où la consommation d'alcool est faible. L'infection chronique par le virus de l'hépatite B est beaucoup plus élevée dans l'Afrique inter-tropicale, l'Asie du Sud-Est, l'Extrême-Orient mais également dans le Bassin méditerranéen. La fréquence des maladies parasitaires est quasiment nulle dans les pays occidentaux.

	INCIDENCE (nouveaux cas par million et par an)	PREVALENCE (cas par million)
<i>Cirrhose alcoolique</i>	150-250	1 500-2 500
<i>Stéatose non alcoolique</i>		10 000-20 000
<i>Hépatite auto-immune</i>	1-3	10-20
<i>Cirrhose biliaire primitive</i>	5-10	50-100
<i>Exposition au virus A*</i>		500 000
<i>Exposition au virus B**</i>		30 000
<i>Infection chronique par le virus B***</i>		3 000
<i>Infection chronique par le virus C</i>		
Carcinome hépato-cellulaire		10 000
<i>Hémochromatose héréditaire</i>		
<i>Maladie de Wilson</i>	30-40	
<i>Syndrome de Gilbert</i>	30-35	1 5000-2 000
<i>Kyste simple du foie</i>	0,3-0,4	10-15
<i>Hémangiome du foie</i>		30 000
		30 000
		30 000

Figure 36. Fréquence estimée de diverses maladies du foie en France en 2006.

* Sujets ayant des anticorps de type IgG contre le virus A.

** Sujets ayant l'antigène HBs ou l'anticorps anti-HBs.

*** Sujets porteurs chroniques de l'antigène HBs.

D'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.

La fréquence évolue aussi dans le temps au sein d'un pays grâce aux progrès de l'hygiène entraînant notamment une diminution remarquable de l'infection par le virus A. Du fait de la reconnaissance des donneurs de sang porteurs de l'infection par le virus B, des précautions que prennent les sujets se livrant à la toxicomanie intraveineuse et enfin de la vaccination, la fréquence de l'infection par le virus B diminue. Grâce à la reconnaissance des donneurs de sang susceptibles de transmettre le virus C, cette infection devrait également décroître.

3. Bases générales de la cancérogenèse

La cancérogenèse a plusieurs synonymes : tumorigenèse, carcinogenèse et oncogenèse.

Les caractéristiques du cancer définies par Hanahan et Weinberg étaient au nombre de 6 depuis 2000. En 2009, une septième a été décrite par Colotta et al. sous les traits de **l'inflammation**, actualisant ainsi les capacités acquises du cancer. Ces traits sont également retrouvés dans le CHC (figures 37, 38).

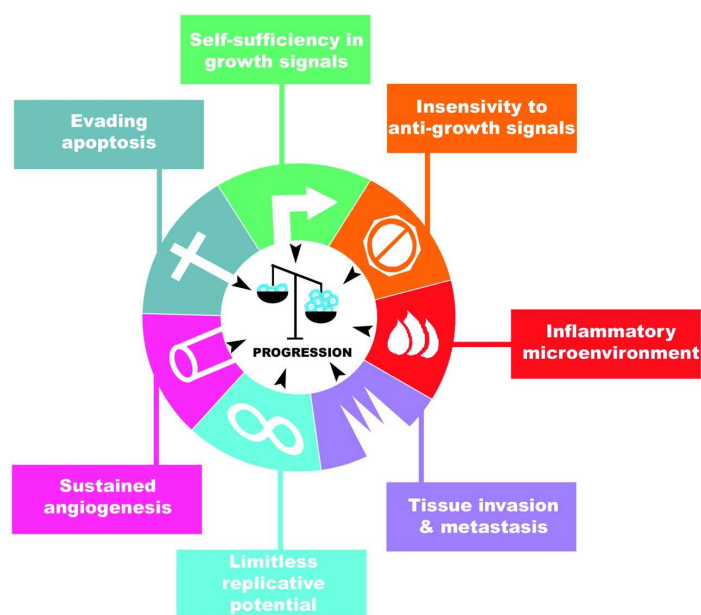


Figure 37. Les 7 caractéristiques fonctionnelles acquises du cancer :

- Auto-suffisance vis-à-vis des signaux de croissance
- Insensibilité aux signaux inhibant la croissance
- Microenvironnement inflammatoire
- Invasion tissulaire et métastases
- Potentiel de réplication illimité
- Angiogenèse active
- Evitement de l'apoptose

(Colotta et al, 2009)

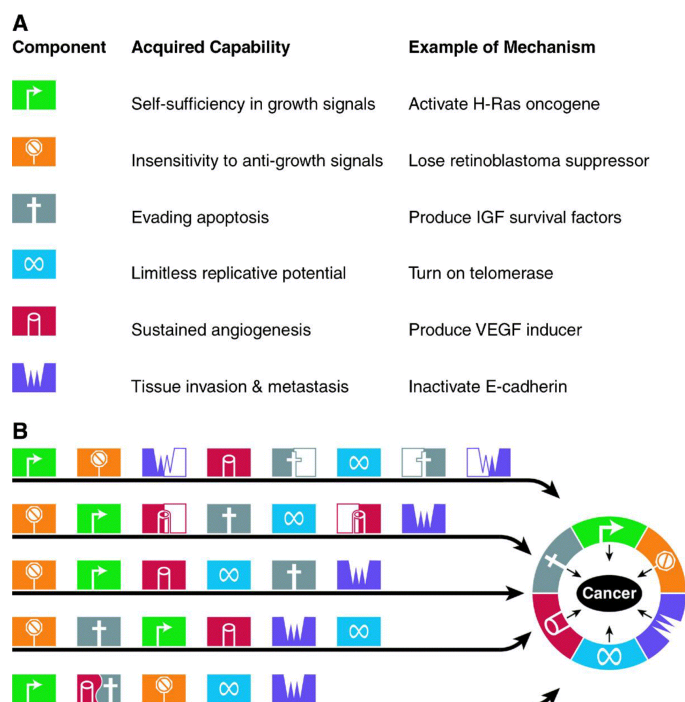


Figure 38. Les différentes voies de la cancérogenèse. Les caractéristiques (A) sont acquises selon un ordre et une manière (B) dépendantes du type de cancer.

Dans certaines tumeurs, une lésion génétique peut entraîner plusieurs caractéristiques simultanément, comme la mutation du gène suppresseur de tumeurs p53 facilite à la fois l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose ainsi que l'instabilité génomique. L'invasion/métastases et la résistance à l'apoptose peuvent chacune être acquises en deux étapes, faisant varier le nombre total d'étapes (Hanahan & Weinberg, 2000).

Il n'y a pas un cancer mais des cancers d'une infinie variété et des réponses aux traitements différentes suivant les malades. Cependant, à l'origine d'un cancer, on trouve toujours le dysfonctionnement d'un ou de plusieurs gènes, qui codent des protéines impliquées dans le développement des tumeurs. De 10 à 100 mutations dérèglent une cellule, mais la difficulté est de mettre en évidence celle(s) qui génère(nt) le dérèglement qui conduira au développement tumoral final « la progression ». Ces protéines accélèrent la division cellulaire, bloquent la mort naturelle des cellules ou leur permettent d'essaimer en métastases. La carte d'identité des tumeurs indique quels gènes, parmi les 30 000 gènes humains, sont dérégulés dans une tumeur donnée.

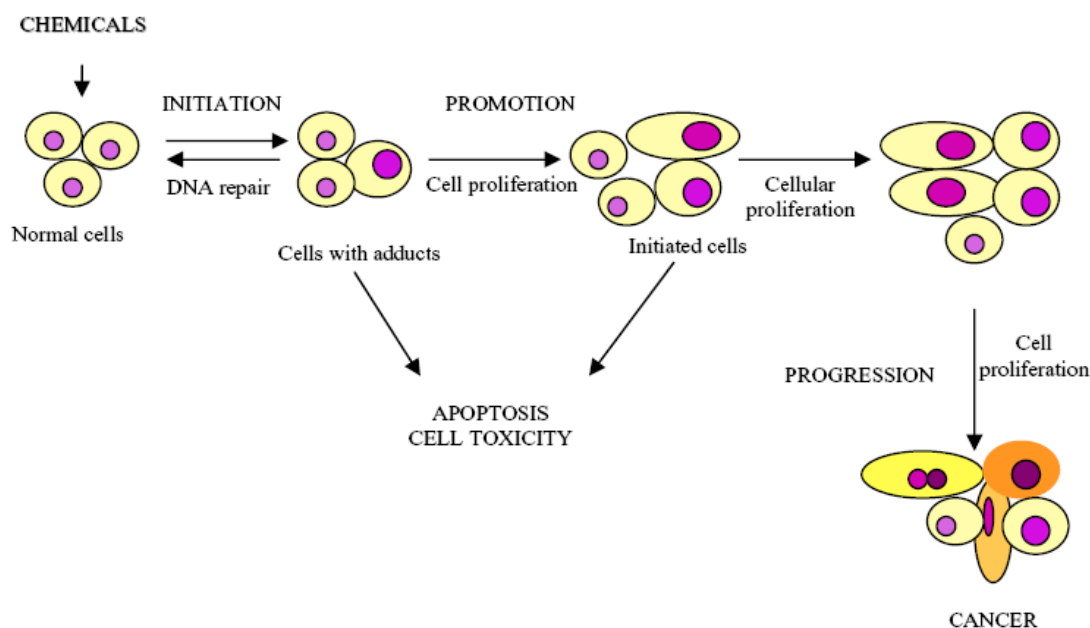


Figure 39. Les 3 étapes de la cancérogenèse. La transformation est souvent un processus lent qui inclut des étapes d'initiation potentiellement réversibles, puis des étapes de promotion et de progression qui aboutissent à la formation de la tumeur « responsable » de la pathologie cancéreuse (Oliveira et al, 2007).

La cancérogenèse est basée sur l'expansion clonale qui se déroule en 3 étapes (figure 39):

- **L'initiation tumorale** (altérations de l'ADN entre autres des **oncogènes** et des **gènes suppresseurs de tumeurs** suite à l'exposition à un carcinogène génotoxique exogène, qui doit être bioactivé s'il s'agit d'une substance chimique, ou ayant une origine endogène de par une prédisposition génétique). Les mécanismes de réparation de l'ADN et d'apoptose se mettent en œuvre.
- En cas d'échec, l'étape de **promotion** correspond à la prolifération clonale de ces cellules initiées aboutissant à des tumeurs bénignes. Il est à noter l'impact du raccourcissement des télomères et des remaniements chromosomiques sur ces deux premières étapes (Farazi et al, 2003).
- La phase de **progression** ou de **conversion maligne** se définit par l'acquisition de l'indépendance de croissance, de l'expression phénotypique de la malignité, d'une instabilité génétique, d'un accroissement du taux de division augmentant les risques de mutations et procurant un avantage sélectif au clone de cellules tumorales.

4. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)

a. Historique du CHC

C'est au XIX^{ème} siècle, que Rudolf Virchow (1821-1902) définit pour la première fois, le carcinome primaire et métastatique du foie. Lelsch et Kiener, en 1876, constatent deux cas de cancer primitif du foie. Sabourin, en 1881, étudie les tumeurs bénignes de cancer primitif du foie. Hanot et Gilbert, en 1888, établissent une première classification du cancer primitif du foie (macroscopiquement : massif, nodulaire, cancer sur cirrhose et microscopiquement : épithélium trabéculaire, épithélium alvéolaire). En 1890, von Hansemann évalue l'incidence du cancer primitif du cancer.

Il faut attendre **1911** pour que Katsuburo Yamigawa introduise le terme d'hépatome (bénin et malin) et Goldzieher et von Bokay, le terme de **carcinome hépatocellulaire**. La classification d'Edmonson et Steiner selon le grade de différenciation cellulaire du CHC date de 1954 (Annexe 2).

Historiquement, les étiologies associées à l'apparition d'un CHC ont évolué et se sont précisées : la cirrhose (Sabourin, 1881), l'hémochromatose (Letulle, 1897 ; Achard, 1921), le virus de l'hépatite B (Prince, 1970 ; Sherlock, 1970), l' α 1-antitrypsine (Berg et Eriksson, 1972), les androgènes (Bernstein, 1971). Les revues de Barbare et al. et de Bruix et al. ainsi que le Thésaurus National de Cancérologie Digestive (<http://www.snfge.org/data/ModuleDocument/publication/5/pdf/TNCD-chapitre-903.pdf>) dressent aujourd'hui les différents aspects du CHC.

b. Epidémiologie du CHC

Le CHC est la principale tumeur primitive du foie, elle occupe le **5^{ème} rang mondial des cancers pour la fréquence**, et le **3^{ème} pour la mortalité**, causant **600 000 décès par an dans le monde**. En France, le nombre de nouveaux cas a triplé en 20 ans (Remontet et al, 2003). Ce cancer est marqué par une forte prédominance **masculine (80% des cas)**. Les taux de mortalité sont de 12,8/100 000 pour les hommes et de 2/100 000 pour les femmes (Stuver & Trichopoulos, 1994). Sa distribution géographique est très hétérogène, il existe en effet de fortes variations géographiques de prévalence (Bouvier, 2003). En France, 70% des cas se développent en raison d'une consommation excessive d'alcool, tandis qu'en Europe du Sud et au Japon, le CHC trouve son origine dans la forte incidence de l'hépatite C. Enfin, en Asie et en Afrique, c'est le virus de l'hépatite B qui en est la cause (53% des CHC sont liés à VHB dans le monde, 20% en France). Les variations d'incidence sont liées à l'infection par les virus VHB et VHC, la présence d'une cirrhose et des substances toxiques (Aflatoxine B1) expliquant la constante augmentation de son incidence (Benhamiche et al, 1998; Bouvier et al, 2004). L'incidence mondiale est estimée à un million de nouveaux cas par an. **7500 nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2009 en France** (Institut de la Veille Sanitaire <http://www.invs.sante.fr/>) où l'incidence est évaluée de 1 à 5/an/100 000 habitants. L'âge moyen est de **67,5 ans**, il est rare avant 50 ans (5 % des cas), puis son incidence augmente avec l'âge jusqu'à 70 ans chez l'homme, pour diminuer ensuite régulièrement. Les taux d'incidence augmentent jusqu'à 75 ans chez la femme et se stabilisent ensuite (Johnson, 1996). Au total, en 2000, 7 850 certificats de décès portaient la mention de cancer du foie, dont la grande majorité chez l'homme (Remontet et al, 2003). En Europe, le CHC est la première cause de mortalité des patients atteints de cirrhose.

c. Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse

Ces schémas représentent une vue générale des mécanismes conduisant au développement d'un CHC (figures 40-43).

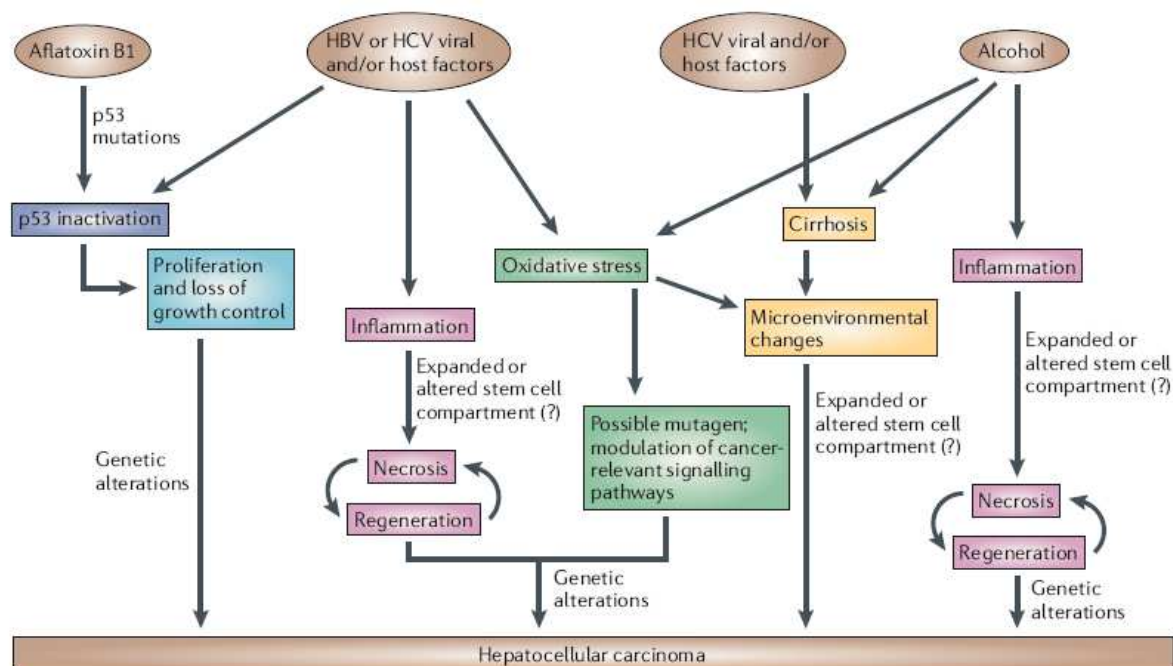


Figure 40. Mécanismes de l'hépatocarcinogénèse pour les différents facteurs de risque. En plus de ces mécanismes, le virus de l'hépatite B (HBV) et l'aflatoxine B1 partagent la caractéristique d'affecter le génome, l'HBV peut intégrer le génome de l'hôte et l'aflatoxine B1 est un mutagène. HCV, virus de l'hépatite C (Farazi & DePinho, 2006).

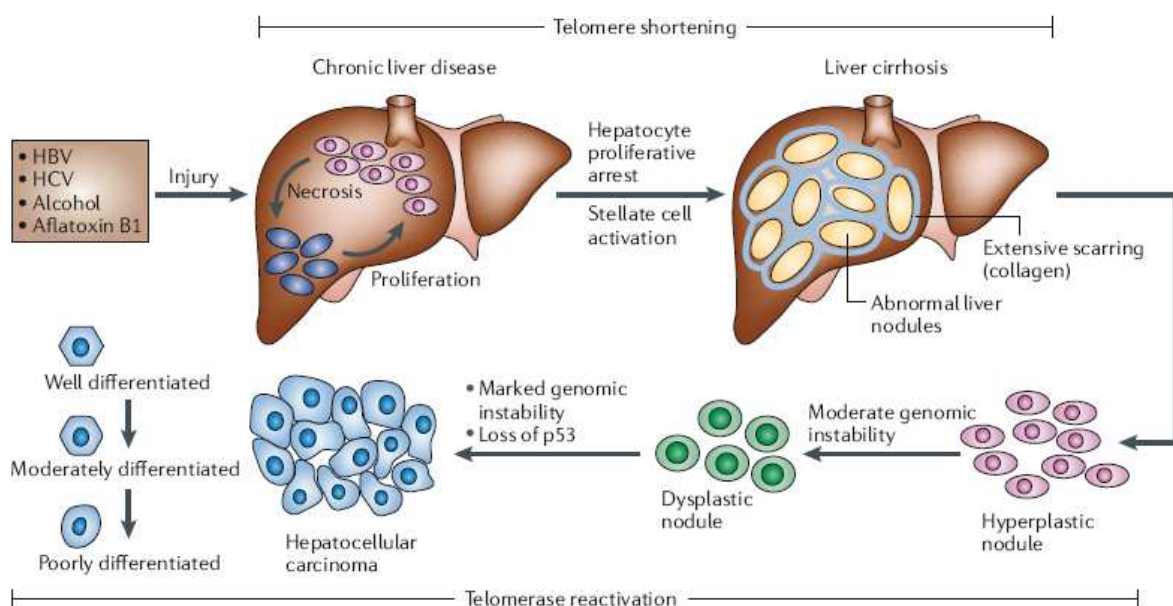
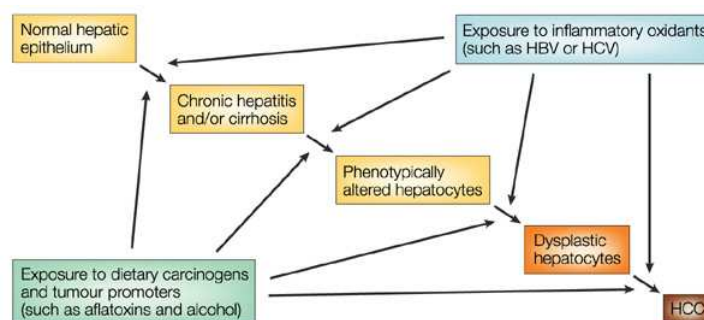


Figure 41. Progression histopathologique et caractéristiques moléculaires du CHC. Suite à une lésion hépatique due à plusieurs facteurs (HBV, HCV, alcool et aflatoxine B1), survient une nécrose suivie d'une prolifération des hépatocytes. Les cycles continus de ce processus destructif-régénératif favorisent les conditions de développement de la maladie chronique du foie qui aboutit à la cirrhose. La cirrhose est caractérisée par la formation anormale de nodules entourés de dépôt de collagène. Des nodules hyperplasiques sont ensuite observés, suivis par des nodules dysplasiques et finalement un CHC, qui peut être classé selon son degré de différenciation cellulaire (de très différencié à faiblement), le faiblement différencié étant la forme la plus maligne du CHC. Le raccourcissement des télomères est retrouvé dans la maladie hépatique chronique et la cirrhose. L'activation de la télomérase a été associée à l'hépatocarcinogénèse, ainsi que la perte ou la mutation de p53 et l'instabilité génomique (Farazi & DePinho, 2006).



Nature Reviews | Cancer

Figure 42. Pathogenèse du CHC. Le CHC typique prend plusieurs dizaines d'années à se développer et survient presque toujours chez des patients cirrhotiques ou atteints d'une maladie hépatique chronique. Les cellules altérées au niveau du phénotype et les hépatocytes dysplasiques servent de précurseurs au CHC. L'infection chronique due à HBV ou à HCV, ainsi que la consommation excessive d'alcool, mènent à une inflammation prolongée et à une hyperplasie régénérative (Kensler et al, 2003).

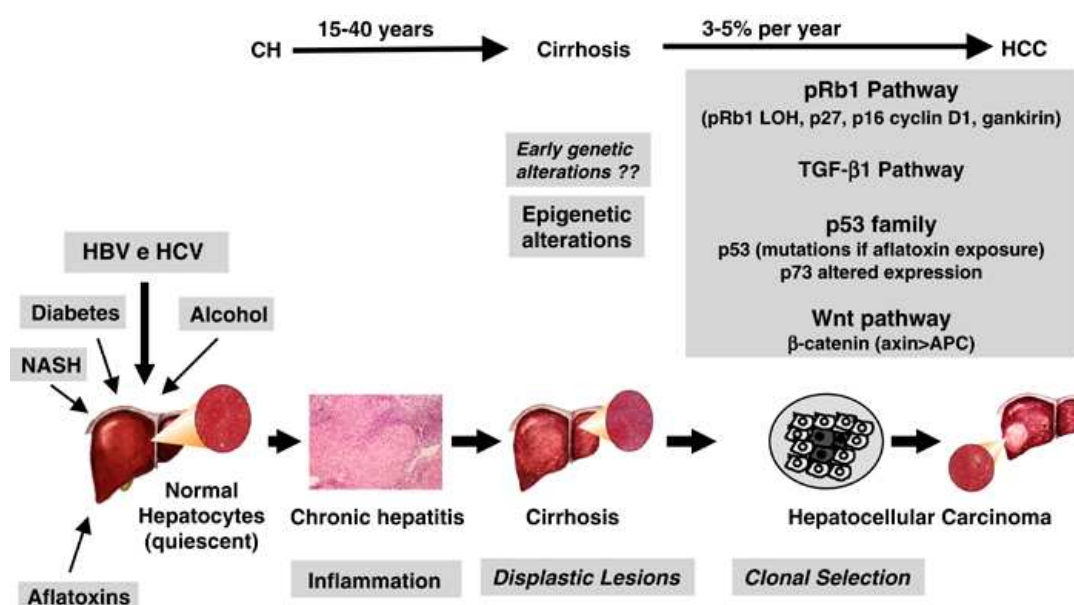


Figure 43. Pathogenèse du CHC (Levrero, 2006)

d. Les altérations génétiques et moléculaires dans les CHC

Si 200 gènes sont dérégulés au stade précoce du CHC, ils sont au nombre de 3000 au stade tumoral (Coulouarn et al. Conference Information: 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2006). La cinétique du CHC et l'identification de réseaux de gènes régulant la cancérogenèse hépatique ont tout d'abord été décrites par Coulouarn chez la souris (Coulouarn et al, 2006). Parce que le cancer est une maladie du génome, le projet International Cancer Genome Consortium (ICGC, www.icgc.org) établit la séquence des génomes tumoraux pour identifier les modifications du génome et imaginer des perspectives pour le traitement de demain comme la médecine personnalisée. Ce programme a mis en évidence les principales mutations du CHC :

- p53 : 20 à 50% du CHC
 - β Caténine : gain de fonction
- } La moitié des cas possède l'une des deux
- Axin 1 < 10% (Satoh et al, 2000)
 - Autres (ex : PiK3CA) < 5%

Le CHC est une **tumeur maligne** qui se définit par la **prolifération incontrôlée** d'une masse cellulaire, par opposition aux tumeurs bénignes où la prolifération reste enclose ou encapsulée. Dans le CHC, la tumeur peut cependant être encapsulée. La prolifération envahit et détruit les structures environnantes : cellules hépatiques, vaisseaux, voies biliaires (cause d'ictère), les nerfs (cause de douleurs). Les métastases sont fréquentes (poumon, péritoine, glandes surrénales et squelette).

Dans le CHC, ce sont les **hépatocytes** qui se transforment en **cellules tumorales**, bien que le développement tumoral à partir de cellules souches hépatiques soit un sujet en pleine expansion.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires du CHC sont nombreux et complexes (figures 46-48), ils ont été étudiés de façon approfondie : l'effet de l'inflammation chronique et de la cirrhose, accompagnés des processus de régénération, l'instabilité génétique des cellules du foie des nodules de régénération, les rôles relatifs des virus des hépatites B (Pollicino et al, 2007) et des hépatites C (Levrero, 2006), la tumorigénicité de l'**aflatoxine B1**, fonctionnent comme des promoteurs de la tumorigenèse. Les profils d'expression des gènes dans le CHC ont été étudiés afin de mieux en comprendre les causes et de définir une signature, ainsi que les tumeurs hépatiques et la **défense de l'hôte**. La progression tumorale pourrait être explicitée par la **mutation du gène suppresseur de tumeur p53** (Amaral et al, 2009; Hussain et al, 2007). La prévalence des **mutations de p53** est similaire dans les CHC associés à HBV et HCV. D'autres mécanismes de défense de l'hôte voient le jour comme la production du **TGF- β 1**, et l'induction des **lymphocytes T cytotoxiques** contribuant à l'**inflammation chronique** (Pages et al, 2010).

L'obésité favorise l'inflammation du foie et la tumorigenèse en induisant l'expression de IL-6 et de TNF- α sur un modèle sans cirrhose (Park et al, 2010).

Les antigènes AFP, MAGE, glypican 3 et NY-ESO, fortement exprimés dans le CHC, sont des cibles potentielles pour les réponses des cellules T. L'infiltration par les cellules T cytotoxiques des tumeurs est un indicateur d'une meilleure survie (Fatourou & Koskinas, 2009).

Les nombreuses **altérations génétiques**, accumulées pendant la cancérogenèse hépatique, peuvent être divisées en **deux voies de cancérogenèse hépatique**.

La **première** concerne les **facteurs de risque des tumeurs du CHC** qui inclut l'intégration de l'ADN du virus de l'hépatite B, la mutation R249S de la protéine p53 chez les patients exposés à l'aflatoxine B1, les mutations KRAS relatives à l'exposition au chlorure de vinyle et les mutations de l'hépatocyte nuclear factor 1- α (HNF1- α) associé aux adénomes hépatocellulaires.

La **seconde** regroupe les **étiologies non spécifiques**, incluant les gains et pertes récurrents de chromosomes, l'altération du **gène p53**, l'activation de la **voie WNT/ β -caténine** à travers les mutations de CTNNB1/ β -caténine et de l'**AXIN1** (axis inhibition protein), l'inactivation des **voies du Rb** (rétinoblastome, gène suppresseur de tumeurs) et du IGF2R (insulin-like growth factor 2 receptor) par l'inactivation de Rb1 (rétinoblastome 1), P16 INK4 et IGF2R.

Deux voies de cancérogenèse hépatique **selon la présence ou l'absence d'instabilité chromosomique** ont donc été établies (figures 44,45).

Le virus de l'hépatite B et les tumeurs peu différenciées sont associés à des tumeurs instables du point de vue chromosomique couplées à des mutations fréquentes de p53.

Pour le VHB, deux voies sont possibles, la perte d'hétérozygotie (LOH : loss of heterozygosity) et l'action de la protéine HBx retrouvée dans 80% des CHC induits par le VHB.

Les tumeurs non liées à l'hépatite B et très différenciées présentent une stabilité chromosomique où la voie β -caténine est activée. Les mutations activatrices du gène β -caténine sont responsables de 30 à 40% des CHC (Laurent-Puig et al, 2001; Laurent-Puig & Zucman-Rossi, 2006). La reptine (ou RUVBL2), connue pour interagir avec la β -caténine, est un acteur pro-oncogénique du CHC, sa surexpression contribue à la résistance des cellules de CHC à l'apoptose (Rousseau et al, 2007).

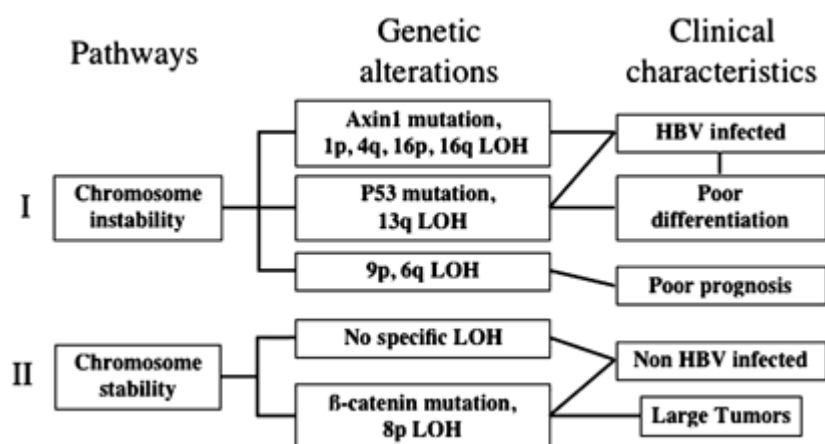


Figure 44. Les voies de la cancérogenèse hépatique définies par les altérations génétiques et leurs relations avec les paramètres cliniques (Laurent-Puig et al, 2001).

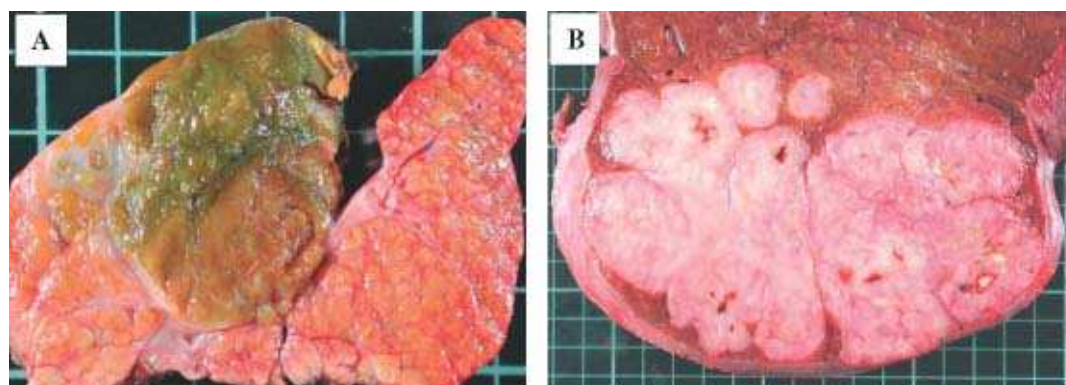


Figure 45. Profil macroscopique du CHC selon le statut de la β -caténine. (A) β -caténine mutée, tumeur de couleur verte (B) β -caténine non mutée, tumeur de couleur blanche (Audard et al, 2007).

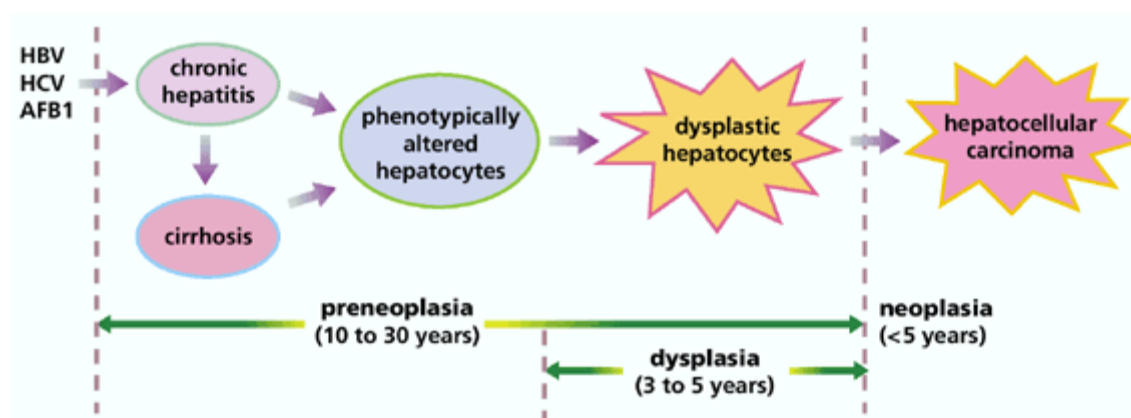


Figure 46. Séquence chronologique des lésions cellulaires aboutissant au développement du CHC chez l'Homme (Thorgeirsson & Grisham, 2002).

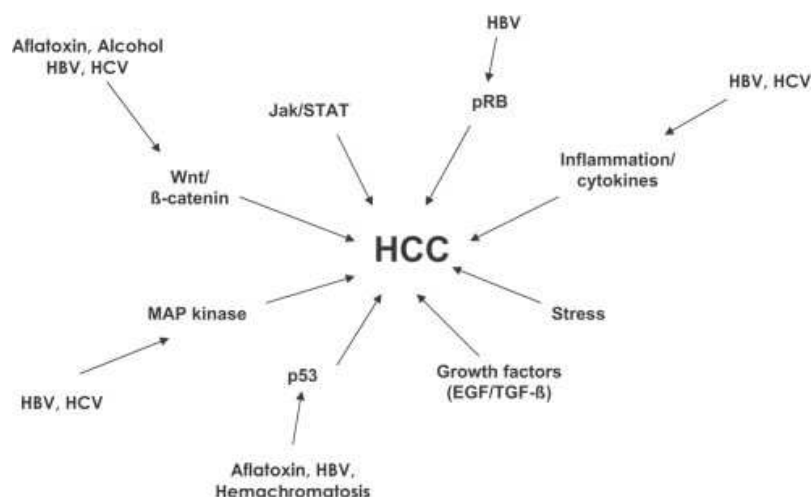


Figure 47. Voies de signalisation cellulaires impliquées dans le CHC. Plusieurs voies de signalisation semblent jouer des rôles déterminants dans le CHC. Ces voies diffèrent dans les différents contextes, en raison des facteurs de risque (Aravalli et al, 2008).

<i>Facteur de risque</i>	<i>Voie affectée</i>
Aflatoxine	Wnt/β-caténine p53
Alcool	Wnt/β-caténine
Virus de l'hépatite B	Wnt/β-caténine p53 pRb MAP kinase Signalisation des cytokines
Virus de l'hépatite C	Wnt/β-caténine MAP kinase
Hémochromatose	p53
Carcinogènes chimiques	Ras

Figure 48. Voies de signalisation cellulaires affectées dans le CHC selon les facteurs de risques (Aravalli et al, 2008)

Pour résumer, une classification moléculaire a été établie par le groupe de Zucman-Rossi (figure 49). Les sous-groupes de CHC G1 à G3, instables au niveau chromosomique, correspondent aux CHC prolifératifs portant des mutations des gènes p53 et Axin 1. Les sous-groupes G4 à G6, qui sont stables, portent une mutation du gène de la β Caténine.

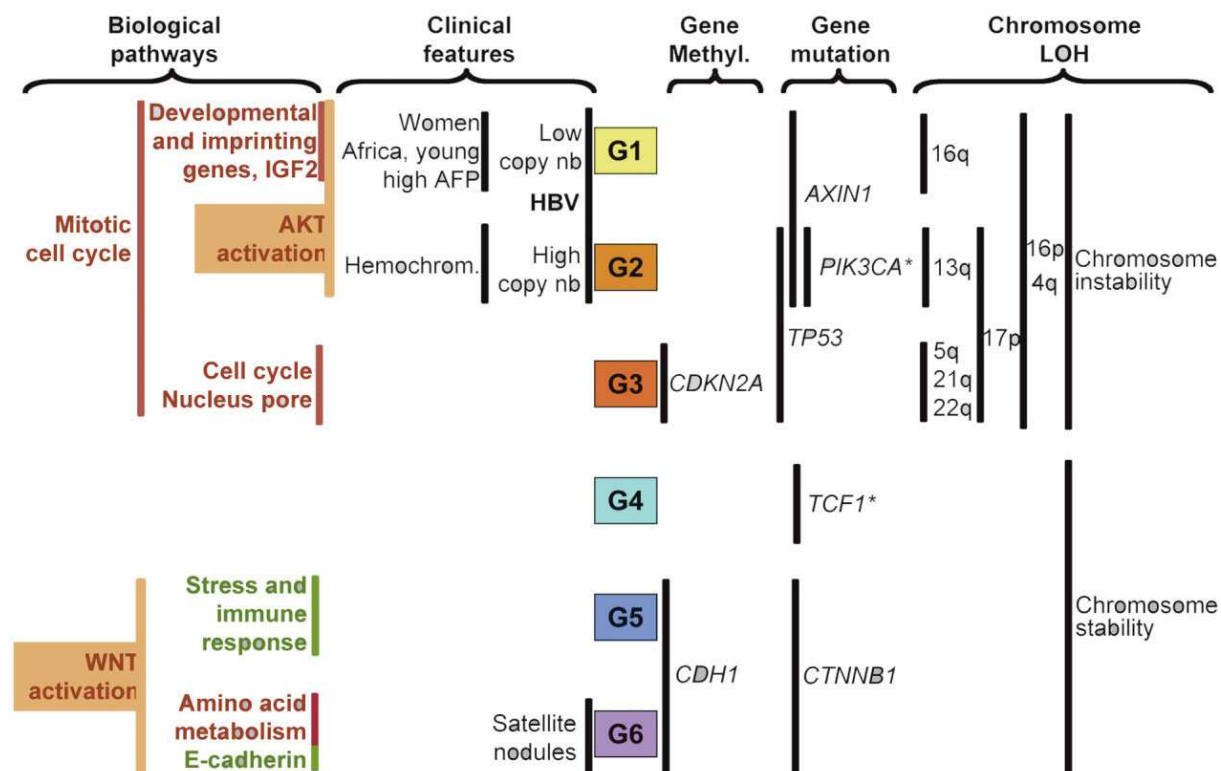


Figure 49. Schématisation des différents sous-groupes de CHC définis de G1 à G6 par analyse transcriptomique avec leurs corrélations génétiques et cliniques. Les lignes verticales indiquent les caractéristiques associées. Les caractères rouges et verts indiquent respectivement les gènes sur ou sous-exprimés, pour chaque catégorie de fonction. LOH, loss of heterozygosity; Hemochrom, hemochromatosis; AFP, alpha-fetoprotein; HBV, hepatitis B virus; * trait rare (Boyault et al, 2007).

Les altérations de ces mécanismes permettent le processus de cancérogenèse hépatique. Cependant, dans certaines étiologies, des traitements peuvent limiter la survenue des altérations génétiques qui concourent à la progression tumorale. Par exemple, le traitement d'interféron alpha de l'hépatite chronique est nécessaire pour retarder ou empêcher la progression de la cirrhose du foie en développement d'un CHC (Marotta et al, 2004).

e. Le rôle des cellules souches dans le développement des cancers

Les progrès récents de la biologie cellulaire et des technologies associées ont permis l'identification des cellules souches cancéreuses (CSC) dans un grand nombre de cancers (Chiba et al, 2009; Kung et al, 2010). Les CSC sont définies comme une population mineure qui possède une capacité de générer des nouvelles tumeurs qui reproduisent fidèlement le phénotype des tumeurs originales dans les tests de xénotransplantations. De plus, les CSC sont capables d'auto-renouvellement et de générer des cellules filles différenciées pour organiser un système cellulaire hiérarchisé similaire aux cellules souches normales. Bien que tous les types de cancer ne suivent pas la théorie des CSC, cela procure un mécanisme cellulaire attractif pour expliquer la résistance thérapeutique et la récurrence de la maladie. Une population mineure ayant des propriétés des CSC a été détectée dans un certain nombre de lignées cellulaires de carcinomes hépatocellulaires et les analyses approfondies caractérisant le système CSC dans les échantillons de CHC primaires sont désormais en cours. Considérant que le CHC a de forts taux de récurrence et de mortalité, de nouvelles approches thérapeutiques sont urgentes. Bien que la pertinence clinique des CSC reste à démontrer, la compréhension approfondie de l'organisation cellulaire du CHC permettrait de développer des thérapies ciblant les CSC.

La capacité d'auto-renouvellement, consécutive à des mutations oncogéniques, est l'un des événements clés des stades précoces de la cancérogenèse (Al-Hajj et al, 2004; Al-Hajj & Clarke, 2004). Les CSC semblent provenir en temps normal des cellules

souches/progénitrices normales avec une capacité d'auto-renouvellement augmentée ou acquise (Figure 50).

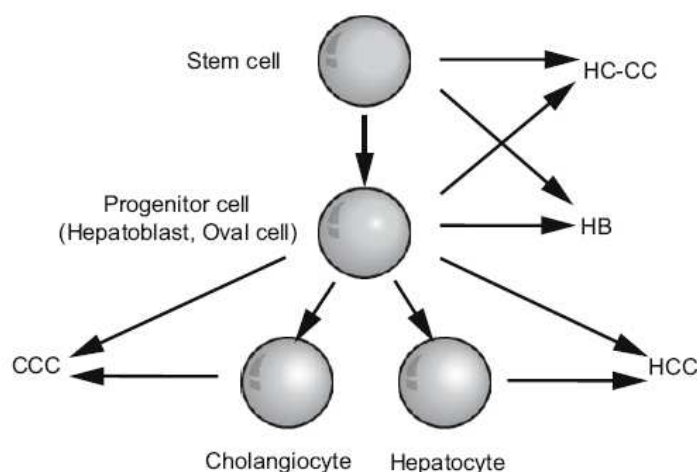


Figure 50. Modèle proposé expliquant l'origine cellulaire des tumeurs malignes du foie. Les tumeurs du foie se développent à partir d'un plus grand nombre de cellules hétérogènes que ce qui était attendu. Les carcinomes hépatocellulaire et cholangiocellulaire (HC-CC) et l'hépatoblastome (HB) semblent dériver d'hépatoblastes primitifs et de cellules souches pluripotentes. Il reste des incertitudes sur le fait que le HCC et CCC trouvent leur origine dans les cellules matures ou les cellules souches/progénitrices (Al-Hajj & Clarke, 2004).

Des approches thérapeutiques pour les CSC peuvent être envisagées notamment pour le CHC par des thérapies moléculaires ciblées, des thérapies de la différenciation et des thérapies à base d'anticorps.

5. Causes

La principale tumeur maligne du foie qu'est le carcinome hépato-cellulaire se développe dans **90% des cas** dans un foie qui est le siège d'une maladie chronique, chez des sujets ayant une **cirrhose**, le plus souvent d'origine **alcoolique** ou **virale (hépatites B et C)**, mais aussi suite à une infection par une **toxine cancérigène** appelée **aflatoxine B1**. Ces causes entraînent tout d'abord une fibrose, suivie d'une cirrhose, qui fait le lit du carcinome hépatocellulaire.

Le foie est le site principal de la détoxification de substances absorbées par le système digestif. Ainsi il est vulnérable aux dommages cellulaires et à la cicatrisation consécutive qui accompagne les **nodules de régénération**. Ces derniers vont dégénérer vers un **état prénéoplasique** qui va précéder la formation du CHC (figure 51). En d'autres termes, une transformation maligne des nodules régénératifs bénins en tumeur maligne s'opère, dans un foie atteint de cirrhose. Il y a progressivement destruction des hépatocytes dans la **cirrhose hépatique** et remplacement par du tissu fibreux. Bien que de nombreux solvants industriels, comme le **tétrachlorure de carbone**, produisent une cirrhose, cet état se développe surtout chez les sujets souffrant d'**alcoolisme chronique** et d'**hépatite chronique**, comme l'indique le tableau des causes fréquentes et rares du CHC (figure 52). Le terrain sur lequel se développe un CHC explique les raisons de la difficulté à traiter et les récurrences fréquentes (El-Serag et al, 2008; Llovet & Bruix, 2008).

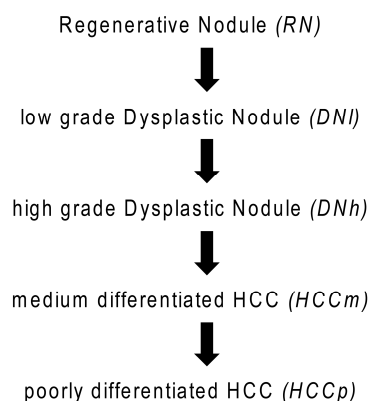


Figure 51. Principales étapes de la carcinogenèse hépatique.

La meilleure caractérisation possible de la tumeur permet d'adapter le traitement. Le CHC est la conséquence de la transformation maligne des nodules de régénération, en particulier les nodules volumineux qui sont le siège d'une dysplasie (Mescam et al, 2010).

Causes fréquentes
Cirrhose posthépatitique B ou B-D Cirrhose posthépatitique C Cirrhose alcoolique Stéatohépatite non alcoolique Hémochromatose héréditaire
Causes rares
Cirrhose auto-immune Cirrhose wilsonienne Cirrhose déterminée par un déficit homozygote en alpha-1-antitrypsine Cirrhose biliaire secondaire Cirrhose biliaire primitive Maladie de Rendu-Osler Maladie de Gaucher Syndrome d'Alagille Maladie de Byler Glycogénose de type I Maladie de Fanconi Stéroïdes anabolisants et/ou androgéniques Fructosémie Tyrosinémie Thorotrast Monomère de chlorure de vinyle Irradiation par les rayons X Ataxie-télangiectasie Hyperplasie nodulaire régénérative Diaphragme sur la veine cave inférieure Insuffisance ventriculaire droite Péricardite constrictive Hépatite chronique médicamenteuse Hypervitaminose A Syndrome de Budd-Chiari

Figure 52. Causes des carcinomes hépato-cellulaires. D'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.

6. Diagnostic

Les tumeurs du foie sont souvent **asymptomatiques** pendant une longue période, d'où un **diagnostic tardif du CHC**. Les circonstances de découverte sont des douleurs de l'hypochondre droit, une altération de l'état général avec amaigrissement et asthénie, une découverte systématique chez un patient porteur d'une cirrhose, ou une décompensation d'une cirrhose sous-jacente. L'objectif est de définir le contexte le plus favorable dans lequel il faut dépister le CHC, à savoir, détecter la tumeur au stade « petit CHC » curable, correspondant à une tumeur nodulaire de moins de 5 cm de diamètre ou multifocale mais comportant moins de 3 nodules de moins de 3 cm de diamètre chacun, sans extension vasculaire, notamment portale et sans métastase extra-hépatique (Trinchet & Ganne-Carrie, 2006).

D'après la revue de Talwalkar (Talwalkar & Gores, 2004), le diagnostic du carcinome hépatocellulaire est un point fondamental pour les cliniciens lors du suivi d'un patient cirrhotique. Un protocole élaboré à la conférence de Barcelone par l'Association Européenne de l'Etude du Foie (EASL) donne les critères pour le diagnostic d'un carcinome. Les critères fondés sur des investigations non invasives (réservés aux patients cirrhotiques) sont l'identification grâce à deux techniques d'imagerie (échographie, angiographie, IRM...) d'un nodule supérieur à 2 cm de diamètre avec hypervascularisation artérielle. Pour les nodules inférieurs à 2 cm, le diagnostic pose problème. La sensibilité et l'exactitude des techniques d'imagerie actuelles sont réduites pour des nodules de cette taille.

L'**alpha-foetoprotéine** (AFP) a été considérée comme un marqueur diagnostique de choix du CHC. Un taux supérieur à 400-500 ng/ml dans le sérum confirme le diagnostic de carcinome. Cependant, ce point est maintenant remis en question car l'AFP n'est pas augmentée dans les CHC débutants (lésions de 1 à 2 cm) et des taux élevés (supérieurs à 400 ng/ml) sont aussi observés chez des patients atteints de cirrhose virale sans preuve d'un CHC.

Le **Glypican-3 (GPC3)**, protéine de la famille des héparanes sulfate protéoglycane, est surexprimé dans 75% des CHC ce qui en fait un marqueur histologique et sérologique. L'association du GPC3 et de l'AFP est un outil diagnostique efficace avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 76% à 84%. En carcinogenèse hépatique, le GPC3 semble jouer un rôle pro-oncogénique majeur via la voie Wnt/ β caténine.

Le dosage du des-carboxyprothrombine (DCP) montre une haute spécificité dans la distinction de lésions malignes. Son utilisation pour des lésions inférieures à 2 cm reste encore à étudier.

Le screening du CHC par **échographie bi-annuelle** et **dosage de l'AFP** permettront d'améliorer la précocité du diagnostic chez les patients à risque (Albrecht, 2008).

a. Manifestations cliniques

Le diagnostic de l'hépatocarcinome est souvent fait à l'occasion d'une **aggravation de la cirrhose**, avec apparition d'une ascite et/ou d'un ictère. Le CHC peut être également révélé par un hémopéritoine, en raison de la rupture d'un nodule néoplasique, ou par un ictère, en cas d'envahissement des voies biliaires. Ce type de tumeur s'accompagne rarement de manifestations paranéoplasiques à type de polyglobulie, hypoglycémie et hypercalcémie. Actuellement, en raison d'une surveillance accrue des malades cirrhotiques, la découverte de CHC de petite taille et asymptomatiques est de plus en plus fréquente et devient majoritaire.

b. Examens paracliniques

Le diagnostic repose sur des dosages de taux d'alpha foeto-protéine mais doit être précisé par une échographie abdominale et un scanner hépatique ou une IRM.

- **Examens biologiques** : élévation des phosphatases alcalines, de la γ -GT. L'alpha-foetoprotéine (taux > 400-500 ng/mL) est un marqueur diagnostique tumoral du CHC augmenté dans 60 à 95% des cas mais ce marqueur est peu spécifique et peu sensible. L'alpha-foetoprotéine peut être élevée en cas d'hépatite, et elle peut être normale en présence du CHC.

Afin de détecter la lésion et de la caractériser en spécifiant son grade dans le processus de cancérogenèse, l'imagerie médicale représente un outil d'aide au diagnostic et présente l'avantage d'être non invasive et sûre en comparaison de la biopsie souvent douloureuse pour le patient.

- **L'échographie** est essentielle : présence de zones hypo- et hyper-échogènes

- **Scanner et IRM** : après injection intra-artérielle du Lipiodol Ultra-Fluide (LUF). L'élément habituel est le rehaussement vasculaire au temps artériel précoce (figure 53, 56)
- **Artériographie** : mise en évidence d'une tumeur hypervascularisée
- **Artériographie avec injection intra-artérielle hépatique** d'une émulsion de lipiodol suivie 15 jours plus tard d'un **examen tomодensitométrique**. Le lipiodol injecté par voie artérielle hépatique a comme particularité de se fixer au niveau du tissu tumoral et d'y rester plusieurs semaines à haute concentration.
- **Biopsie** : utile en cas de tumeur de petite taille, elle comporte un risque de dissémination néoplasique. Elle n'est pas nécessaire en cas de cirrhose, si la tumeur fait plus de 2 cm et a les caractéristiques typiques du CHC au scanner ou à l'IRM. Elle apporte une certitude diagnostique dans 60 à 90 % des cas et est indiquée dès qu'un doute persiste quant à la nature de la tumeur.

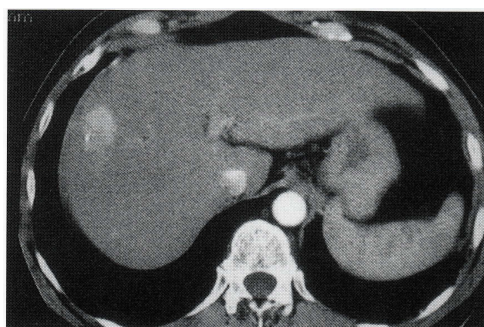


Figure 53. Tumeur maligne du foie (CHC). Scanographie après injection intraveineuse de produit de contraste. Temps artériel. La tumeur se traduit par une zone hyperintense signe d'hypervascularisation. D'après Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.

Lors de la transformation du nodule en tumeur maligne, les apports vasculaires sont modifiés. En effet, l'apport portal est diminué alors que l'apport artériel est augmenté. Cette augmentation est due à la naissance de nouveaux micro-vaisseaux qui viennent irriguer la tumeur appelée néo-angiogenèse (figures 54,55). Ces changements étant difficiles à quantifier, ils ont fait l'objet d'une **modélisation** numérique pour une meilleure compréhension des **images IRM** du foie (Mescam et al, 2007).

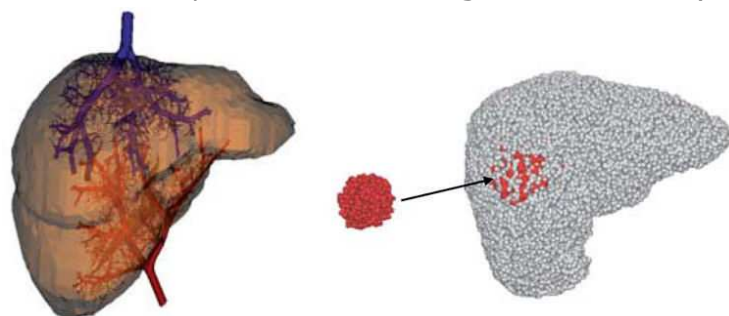


Figure 54. Modèle du réseau hépatique vasculaire.

Gauche : Modélisation 3D de la croissance des arbres vasculaires (arbres artériel et veineux) du foie ; *Droite* : Modélisation d'une région tumorale (hypervascularisée) dont les caractéristiques géométriques et physiologiques diffèrent de celles d'un tissu sain (cellules rouges correspondant au tissu tumoral) (Mescam et al, 2007).

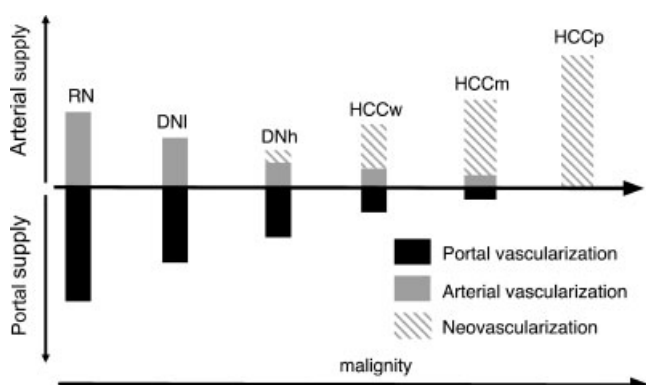


Figure 55. Evolution de l'apport sanguin pendant la carcinogenèse hépatique.

(RN : nodule régénératif; DNI,h : dysplasie nodulaire de faible, de haut grade; HCCw,m,p : HCC très, modérément et faiblement différencié) (Mescam et al, 2007).

Les progrès en imagerie associés au diagnostic biologique (recherche de biomarqueurs) sont tels que la biopsie n'est plus systématique avant une transplantation de foie (Compagnon et al, 2008).

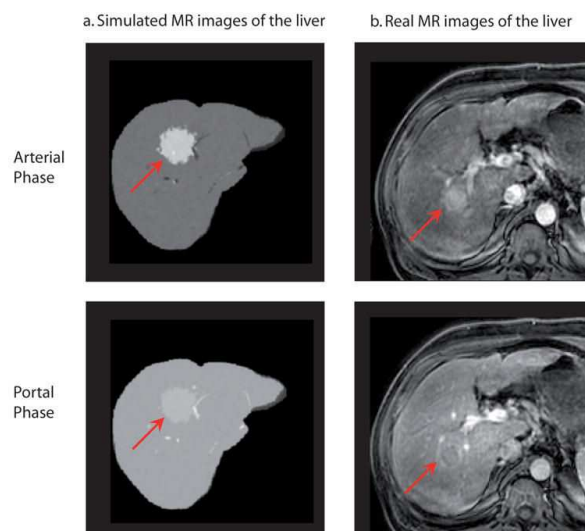


Figure 56. Comparaison d'images IRM a) simulées et b) réelles d'un foie atteint d'un carcinome hépato-cellulaire. Les flèches rouges indiquent la tumeur. Phase artérielle (16 s après injection). Phase portale (60 s après injection) (Mescam et al, 2007)

c. Marqueurs pronostiques

De nombreuses études multifactorielles ont cherché à trouver des facteurs pronostiques de la survie des malades porteurs d'un carcinome hépatocellulaire, comme en témoignent les nombreuses classifications (Annexe 2). Les facteurs mis en évidence sont en rapport avec l'état de la fonction hépatique, l'état général du patient et l'extension tumorale (figure 57). Ils peuvent d'ailleurs être communs à plusieurs classifications. Les plus récentes ont été effectuées sur des cohortes importantes et ont mis en évidence des facteurs pronostiques à l'aide d'analyse multivariée.

Fonction hépatique	Bilirubine Phosphatases alcalines Albumine Hypertension portale Ascite
Tumeur	Taille ou volume tumoral Nombre de nodules Envahissement vasculaire α -foetoprotéine
Etat général	Index de Karnofsky Statut malade

Figure 57. Principaux critères des classifications (Dilou et al, 2004).

Les facteurs pronostiques du CHC courants sont également la recherche des antigènes de surface de l'hépatite B, de l'hépatite C, la présence d'une cirrhose, l'encapsulation de la tumeur, l'infiltration vasculaire, l'existence d'une tumeur secondaire, le dosage de l'alpha-foetoprotéine, la taille de la tumeur et la marge de résection.

La détection par coloration immunohistochimique du ligand Fas après résection d'un CHC, annonce un pronostic plus sombre qu'en absence de Fas : $28,34 \pm 4,08$ mois quand le ligand Fas est exprimé comparés aux $55,31 \pm 5,37$ mois sans Fas ($p = 0.0003$). Le ligand Fas, membre de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor), active le domaine de mort de Fas pour initialiser la cascade des caspases et l'apoptose, dont l'apoptose des cellules T (Lee et al, 2004).

Pour estimer correctement le pronostic, il faut tenir compte aussi bien des caractéristiques de la tumeur que de la gravité de l'hépatopathie sous-jacente. En effet, un certain nombre de décès survient du fait des complications de la cirrhose (décompensation de la fonction hépatique, hémorragie, infection...) même si l'amélioration de la prise en charge des malades cirrhotiques en a réduit le nombre et permis d'améliorer nettement l'espérance de vie de cette population (Garcia-Tsao, 2001). La gravité de la cirrhose va conditionner les possibilités thérapeutiques. De plus, le pronostic est très variable même en l'absence de traitement spécifique. Chez des malades à fonction hépatique conservée non-traités, la survie est de 50 % à 2 ans (Cottone et al, 1989). Ceci explique les difficultés pour estimer correctement le pronostic de ces malades et la nécessité d'utiliser plusieurs classifications qui combinent des critères évaluant la fonction hépatique, l'évolution de la tumeur, l'état général et le type de traitement effectué.

Grâce à l'essor de nouvelles technologies telles la transcriptomique et la génomique fonctionnelle, de nouveaux marqueurs pronostiques apparaissent : l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), le TGF- α (Transforming Growth Factor-alpha), et leurs récepteurs sont des marqueurs combinés du pronostic du CHC (Daveau et al, 2003). Coulouarn a été le premier à définir une signature moléculaire transcriptomique du CHC, c'est-à-dire, un ensemble de gènes qui caractérisent une situation pathologique (Coulouarn et al, 2009). Le développement d'une plate-forme d'analyse transcriptomique spécifique du foie, en comparant du foie fœtal, adulte et atteint par le CHC, a procuré un formidable outil à travers cette base de données et a mis en évidence l'expression de nombreux gènes corrélée au degré d'inflammation (Coulouarn et al, 2004). Cette étude indique la réminiscence d'un programme transcriptionnel typiquement fœtal dans le CHC, caractéristique du développement tumoral.

Il existe en effet un parallèle entre la formation d'un embryon et le développement d'un cancer, l'exemple le plus frappant étant la vitesse de la prolifération cellulaire. De nombreux points communs existent entre ces deux processus se caractérisant entre autres par le passage d'une cellule unique à un groupe de plusieurs cellules, à tel point que le développement embryonnaire est parfois considéré comme le « miroir inversé » de la cancérogenèse. Les études sur la relation entre le cancer et les gènes du développement contribuent à renouveler significativement la connaissance de la carcinogenèse et du développement métastatique (Okamoto et al, 2004).

La suppression constatée dans le CHC du dudulin-2 mRNA, normalement impliqué dans l'apoptose, indique un marqueur potentiel de la transition entre la cirrhose et le carcinome (Coulouarn et al, 2005). L'induction de l'oncogène Met, corrélée à une forte densité de micro-vaisseaux, correspond à un marqueur de pronostic sombre et de phénotype agressif (Kaposi-Novak et al, 2006). Le TGF- β a des propriétés doubles, oncogénique et suppresseur de tumeur, il présente une signature spécifique dans le CHC s'il est augmenté, ce qui a été démontré sur deux populations de tumeurs, précoce et tardive (Coulouarn et al, 2008)(Brevet WO/2009/055480).

L'avènement de la protéomique a permis de dresser des profils d'expression protéique associés à une pathologie. Cette approche a procuré la signature de maladies. La protéomique offre une formidable méthode de recherche de marqueurs du CHC (Chaerkady et al, 2008). Lors d'opérations chirurgicales, des cellules tumorales et saines ainsi que des échantillons de sang sont prélevés pour comparer les compositions protéiques. Par analyse différentielle, le but est de déterminer les protéines présentes dans le sang qui portent le sceau de l'atteinte cancéreuse. Ainsi, l'objectif est de dépister les tumeurs dans des fluides, comme le sang, pour éviter les biopsies plus invasives. 1 à 3 décès pour 10 000 biopsies du foie sont enregistrés, ce qui est loin d'être négligeable rapporté aux 600 000 porteurs de l'hépatite C en France susceptibles de développer un cancer du foie. Les marqueurs de dépistage constituant la signature d'une maladie sont donc précieux.

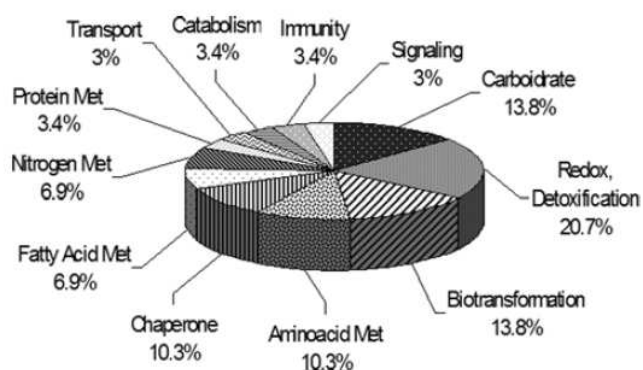


Figure 58. Classification fonctionnelle des 29 protéines différentielles exprimées identifiées dans le CHC (Corona et al, 2010).

Les protéines dérégulées associées au développement d'un CHC ont été identifiées. 29 protéines dérégulées, appartenant à des voies métaboliques différentes, ont été identifiées (figure 58). La détoxification, le métabolisme des hydrates de carbones, et la biotransformation des acides amines représentent les principales voies concernées. L'augmentation d'expression de l'aldo-keto reductase 1C2, de la thiorédoxine et de la transketolase, impliquées dans les processus métaboliques et de régulation incluant la prolifération, la différenciation et la cancérogenèse est remarquable. Ces protéines pourraient représenter des biomarqueurs et de nouvelles approches pharmacologiques (Corona et al).

Les dérégulations post-transcriptionnelles ont été analysées par la méthode FunREG, notamment sur l'ARN non codant, appelé micro ARN qui inhibe la traduction d'un ou de plusieurs ARNm ou augmente la dégradation d'un ARNm. Chez l'homme, environ **750 micro ARN** sont répertoriés et annotés dans **la base de données miRBase**. Le **micro ARN mir-122** est **spécifique du foie**, il interagit et inhibe l'expression de la cycline G1. Son expression est **diminuée dans le CHC** (Kutay et al, 2006). Le micro ARN mir-122 est prédictif de la survie des patients. Quand il est réprimé, un faible index apoptotique est observé, associé à un processus fortement invasif, correspondant à un grade d'Edmonson élevé (Annexe 2 : Grade III/IV où le CHC est peu différencié et difficile à diagnostiquer, présentant un profil compact tumoral et un cytoplasme peu visible) (Edmondson & Steiner, 1954). Si les micro ARN mir-122 s'effondrent, le pronostic est très sombre car la perte de mir 122 est associée à la perte de la différenciation, à l'acquisition d'un phénotype invasif, donc de métastases et à la suppression du phénotype hépatique. RHOA est une cible naturelle de mir-122 qui fera l'objet d'études de molécules thérapeutiques (Coulouarn et al, 2009). D'autres micro-ARN signent le CHC (figures 59,60), ce sont miR-18, miR-21, miR-221, miR-222, miR-224, miR-373 et miR-301 qui sont induits, tandis que miR-122, miR-125, miR-130a, miR-150, miR-199, miR-200 et les membres de la famille let-7 sont réprimés (Bala et al, 2009). Les plus recherchés sont mir-21, 221, 224, 199 et 122. Les micro ARN sont d'autant plus intéressants pour le pronostic qu'ils peuvent être circulants au niveau systémique. Une première classification a fait consensus en 2008 (Ladeiro et al, 2008) corroborée par l'étude de Pineau (Pineau et al). Les modes d'action ont été en partie élucidés (Visone et al, 2008), les micro ARN inhibent ou activent le cycle cellulaire en permettant le passage de la phase G1 à la phase S.

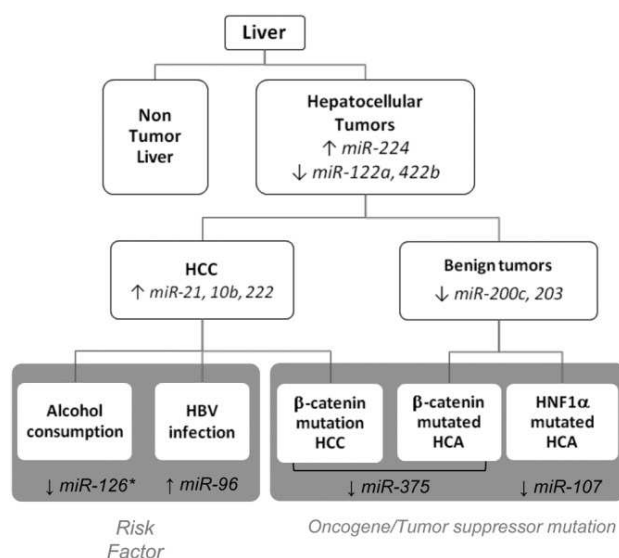


Figure 59. L'Expression des micro-ARN est associée à différents sous-groupes de tumeurs hépatocellulaires. HBV, virus de l'hépatite B; HCA, adénome hépatocellulaire; HCC, carcinome hépatocellulaire; HNF1 α , hepatocyte nuclear factor 1 α . (Ladeiro et al, 2008).

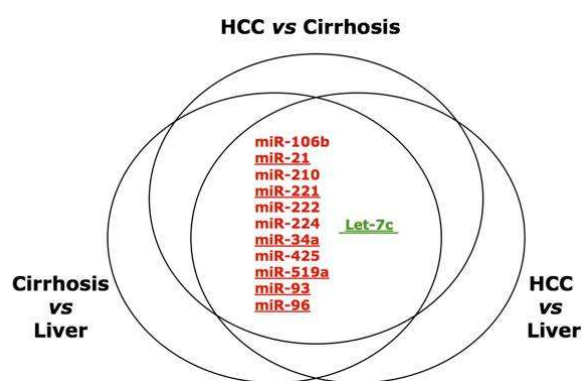


Figure 60. Signatures des micro ARN dans le CHC. L'intersection des micro ARN dérégulés dans trois types de tissus: HCC, cirrhose, et foie normal. Seuls les micro ARN dérégulés dans les lignées issues de CHC sont considérées. En rouge, les micro ARN surexprimés; en vert, les réprimés (Pineau et al, 2010)

7. Traitements

a. Traitement des cancers

Le nombre de molécules évaluées en études cliniques de phase I à phase III a augmenté considérablement entre 1995 et 2005 (de l'ordre de 200 à plus de 800, représentant 30% des molécules en évaluation toutes aires confondues. 40% des publications scientifiques concernent l'aire thérapeutique oncologique entre 2000 et 2005. Cet engouement est lié aux éléments suivants :

- L'exploitation et l'application de plus en plus rapide des connaissances sur le génome, la biologie de la cellule cancéreuse et l'identification des voies majeures de régulation (apoptose, angiogénèse, signalisation via tyrosines kinases)
- L'émergence des biotechnologies, comme le développement des anticorps monoclonaux et des protéines recombinantes
- Le développement de formes galéniques permettant de cibler les principes actifs vers les tumeurs, ainsi que de nanoparticules activables à distance dans le cadre d'une thérapeutique de plus en plus personnalisée
- L'amélioration des capacités de synthèse chimique, de screening à haut débit, d'identification de nouveaux principes actifs et de formulations orales

- Le développement des technologies de type « omics » (études des transcriptomes et protéomes) permettant de mettre en évidence de nouvelles cibles diagnostiques, thérapeutiques ou pronostiques et d'identifier des marqueurs
- l'accélération ou l'optimisation des programmes d'évaluation préclinique et de toxicité

b. Traitement du CHC

La détection précoce et la caractérisation selon les classifications (Annexe 2) sont déterminantes pour le choix de la stratégie et l'efficacité thérapeutiques. Le traitement du CHC se discute en fonction de l'évaluation pré-thérapeutique ayant comporté le bilan d'extension et l'appréciation du terrain (classification de Child Pugh et d'Okuda). Les traitements reposent essentiellement sur :

- Chirurgie (moins de 30% des cas) : 60% de survie à 5 ans (Ishizawa et al, 2009)
- Chimio-embolisation par ^{131}I -Lipiodol (30% des cas) : 30% de survie à 3 ans
- Abstention (30% des cas)
- Sorafénib (Nevaxar®) : survie rallongée de 2,8 mois par rapport au groupe placebo

Ces choix thérapeutiques sont déterminés par différents outils disponibles pour les cliniciens tels que la classification BCLC associée à un algorithme de traitement correspondant aux différents stades (figure 61)(Dilou et al, 2004) ou le modèle de Llovet.

Stade	Intention de traitement	Première/seconde option
Stade A précoce	Curatif	
A1		Résection chirurgicale
A2		Résection chirurgicale/transplantation ou percutané
A3		Transplantation/percutané
A4		Transplantation/percutané
Stade B intermédiaire	Palliatif	Chémoembolisation ± percutané
Stade C avancé	Palliatif	Nouveaux agents
Stade D terminal	Symptomatique	Soins de confort

Figure 61. Proposition d'un algorithme de traitement du carcinome hépatocellulaire (Dilou et al, 2004).

Llovet a proposé un modèle de prise en charge thérapeutique du CHC selon la classification BCLC (figure 62), qui prend en compte l'état clinique du patient, le type de tumeur, le stade d'Okuda et la fonction hépatique (Llovet, 2005) :

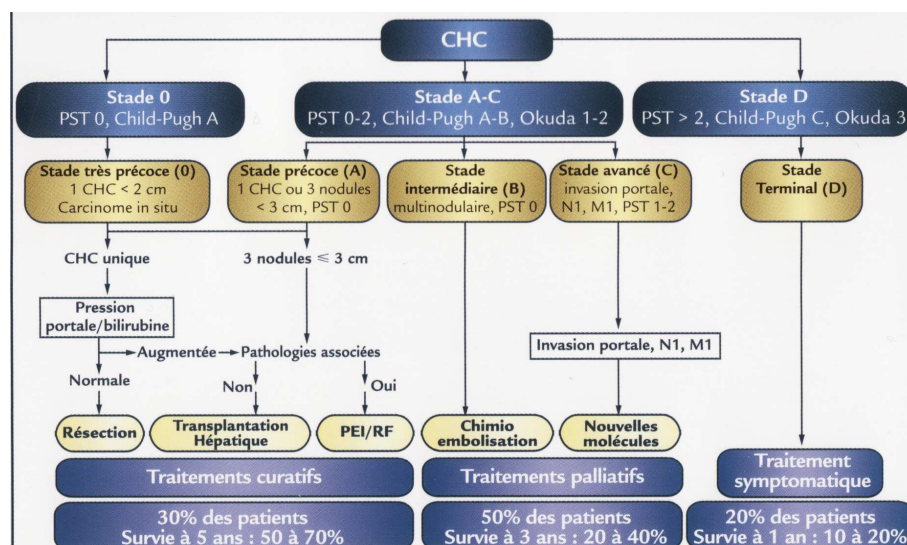


Figure 62. Proposition de stratégie pour le traitement du CHC. PST : performance status, PEI : alcoolisation percutanée, RF : ablation par radiofréquence (Llovet, 2005).

c. Le traitement chirurgical

Le traitement chirurgical représente la solution la plus efficace (Hasegawa & Kokudo, 2009) regroupant la résection et la transplantation hépatiques. Ces dernières ont été comparées dans le cadre du traitement chirurgical des CHC précoces associés à une cirrhose de stade Child-Pugh A (Zhou et al, 2010). Quand la taille et le nombre de tumeurs sont inférieurs ou égaux à 4 ou que l'invasion veineuse au niveau microscopique est absente, il n'y a pas de différence significative de survie entre les deux groupes, la résection hépatique reste alors le traitement de choix. Quand ce nombre est supérieur à 4 ou bien qu'il existe une invasion veineuse microscopique, la survie est meilleure pour le groupe ayant été transplanté.

- **La résection chirurgicale :** En cas de CHC sur cirrhose, seuls sont opérables les CHC de petite taille et d'extension intrahépatique limitée, non compliqués de thrombose portale, non métastasés et chez un patient n'ayant pas d'insuffisance hépatocellulaire (Child Pugh A, Okuda I), ce qui représente actuellement **moins de 10 % des CHC**. Les principaux facteurs influençant la survie sont le stade de Pugh, la taille de la tumeur et son caractère encapsulé ou non. Le risque de récurrence est important (+ de 50 % à 3 ans).

La sécurité et la précision de la résection hépatique ont continuellement progressé grâce aux avancées chirurgicales mais aussi aux soins péri-opératoires (Ishizawa et al, 2009; Martinez-Llordella et al, 2008) comme la restauration des réserves hépatocytaires d'ATP au cours de la conservation hypothermique du greffon avant transplantation utilisant des liposomes d'ATP (Korb et al, 2008), ce qui fut amélioré par un ligand lactosylé ciblant les hépatocytes (Tep et al, 2009).

- **La transplantation hépatique :** S'adresse en pratique aux malades ayant une tumeur unique de taille inférieure à 5 cm ou égale à trois tumeurs de taille inférieure à 3 cm. Les malades ayant une insuffisance hépatocellulaire peuvent être transplantés. Il est important de considérer le délai entre l'inscription sur la liste des attentes de transplantation et la pratique de celle-ci. Dans l'intervalle, une chimioembolisation lipiodolée peut être réalisée. La place de la transplantation hépatique dans le traitement des CHC reste à définir compte tenu du risque de récurrence qui semble important à 3 ans. Les indications de la

transplantation semblent pratiquement les mêmes que celles de la résection. Les CHC sur foie sain sont rares, permettant de réaliser une large hépatectomie ou une transplantation (Mazzaferro et al, 2008).

d. Le traitement médical

La **chimiothérapie** par voie générale ou le traitement hormonal sont très décevants. Si les chimiothérapies conventionnelles sont en général de plus en plus efficaces sur les cancers, ce n'est pas le cas du cancer primitif du foie. Elles provoquent de nombreux effets secondaires (les plus connus étant la perte de cheveux, les nausées, les vomissements et le syndrome main-pied) parce qu'elles touchent également les cellules saines (Boucher et al, 2002; Edeline et al, 2009).

L'**hypoxie** (manque d'oxygène) et l'**anoxie** (manque complet d'oxygène) sont présentes dans la plupart des tumeurs solides. L'hypoxie semble être un facteur important dans la progression tumorale. En réponse à une hypoxie aigüe, des facteurs transcriptionnels sont activés, connus sous le nom de HIF1 et HIF2. Les enzymes du métabolisme des drogues sont réprimées par l'hypoxie dans les cellules d'hépatome humain HepaRG, comme le CYP3A4 par HIF1-alpha ce qui pourrait compromettre l'efficacité des agents chimiothérapeutiques dans le CHC. Les cellules HepaRG pourraient constituer un nouveau modèle d'évaluation de l'efficacité des anticancéreux en conditions normales versus hypoxiques (Legendre et al, 2009).

Des réponses différentes aux traitements sont constatées selon les patients ainsi que l'apparition de résistances aux médicaments. La **résistance** aux thérapies s'explique par une mauvaise irrigation de la tumeur en raison de l'hypertension porte ayant pour conséquence une moindre accessibilité des agents anti-cancéreux, un manque d'oxygène, une activation du régulateur central de l'expression de gènes en hypoxie appelé HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor), et une modulation de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX).

- **la chimio-embolisation par ¹³¹I-Lipiodol (lipioCis®).** Le lipiodol est une huile extraite de l'œillette qui est riche en iode (38%). Injecté par voie artérielle hépatique, il se fixe pour plus de 75% au niveau du foie et persiste plusieurs semaines au niveau de la tumeur. Il peut être associé à différentes substances cytotoxiques comme l'adriamycine ou le cisplatine. Couplée à l'embolisation, cette technique permet de réduire le volume tumoral chez plus de 50% des patients. La chimio-embolisation peut être renouvelée tous les deux mois. Elle s'adresse aux patients n'ayant pas d'insuffisance hépatocellulaire ni de thrombose portale. Elle nécessite une surveillance clinique et biologique stricte. L'injection intra-artérielle de **lipiodiol radioactif marqué à l'iode 131** (lipioCis®) permet de traiter des tumeurs de tailles variables, éventuellement associées à une thrombose portale. Son efficacité est équivalente à celle de la chimio-embolisation et sa morbidité plus faible. Elle peut être répétée à plusieurs reprises, avec un intervalle de 2 à 3 mois (Boucher et al, 2008; Boucher et al, 2007).

De nombreuses optimisations sont testées et développées afin d'optimiser les effets thérapeutiques et diminuer les effets secondaires comme le changement du radionucléide (Garin et al, 2010; Raoul et al, 2010). Il était en effet constaté que la fixation tumorale était variable (20 à 40% de réponse), peu efficace sur des lésions volumineuses et s'accompagnait d'une toxicité pulmonaire.

Trois voies d'optimisation ont été envisagées, la deuxième voie a fait l'objet de la thèse de S. Becker :

- Le changement du radionucléide au profit de l'Yttrium 90 et du Rhénium 188

- L'augmentation du rapport tumeur/foie en améliorant la fixation intracellulaire, l'embolisation et l'action vasculaire
- La potentialisation en améliorant le cocktail d'isotopes et l'association thérapeutique

La fixation tumorale et pulmonaire a été améliorée en présence de Dexaméthasone (DXM) et Tamoxifène (TMX) qui agissent sur la fluidité membranaire pour augmenter la perméabilité au lipiodol, mais sans différence sur le rapport tumeur/foie.

De nouvelles formulations ont ensuite été synthétisées pour agir sur la viscosité du lipiodol (Cadeillan, Colloque recherche de la fédération Gay-Lussac, Rennes, 2008). L'association du lipiodol avec l'acide stéarique qui a un effet rigidifiant de par son acide gras saturé a été testée in vivo ce qui a augmenté la fixation dans la tumeur aux dépens de la fixation dans le foie sain et le poumon. L'augmentation de la viscosité de 49 à 60 cP à 20°C au lieu des 45 cP a optimisé les effets thérapeutiques et diminué les effets secondaires, ce qui n'est pas le cas au-delà de 60 cP. Les perspectives veulent développer l'association DXM/TMX/ lipiodol/acide stéarique ainsi que l'association lipiodol radiomarké/Sorafénib. Enfin, une culture de sphéroïdes succédant aux cellules adhérentes en monocouche est à l'étude.

- **L'injection intratumorale d'éthanol** répétée plusieurs fois au sein d'un CHC peut permettre une destruction de la lésion, en particulier lorsque le CHC présente une petite taille inférieure à 5 cm, visible en échographie, accessible à la ponction et ayant une localisation non immédiatement sous-capsulaire. 5 à 10 cc sont injectés et répétés tous les 2 à 4 jours (ou un volume plus important en une fois).
- **Le traitement par hyperthermie ou radiofréquence** permet de détruire les tumeurs de taille inférieure à 4 cm, soit par voie radiologique lorsqu'elles sont accessibles sous échographie, soit par voie chirurgicale. La radiofréquence peut être répétée.
- **La radiothérapie** est plus efficace si elle est associée à une chimio-embolisation transartérielle (Seong, 2009).

De nouvelles thérapeutiques émergent :

- **L'angiothérapie** vise à empêcher la cellule cancéreuse de se nourrir en bloquant la vascularisation de la tumeur (Guba et al, 2002).
- **Le Sorafénib** commercialisé sous le nom de **Nevaxar®** par Bayer Schering Pharma bénéficie d'une AMM depuis 2006. Le groupe de travail Prodige AFEF (Boige V, 2008) a émis des recommandations pour l'utilisation du Sorafénib (Nevaxar®) dans le traitement du CHC car il s'agit du premier traitement médicamenteux ayant prouvé une efficacité dans le CHC et parce qu'un nombre de malades relevant potentiellement d'un tel traitement est élevé. Ces recommandations ont également été éditées sur la base du thésaurus national de cancérologie digestive, du management du CHC (Bruix & Sherman, 2005), des études de phase II chez des patients porteurs d'un CHC avancé (Abou-Alfa et al, 2006) et de phase III de l'essai SHARP (Llovet et al, 2008). Pour les malades porteurs d'un CHC non réséquable en stade avancé, les thérapeutiques systémiques étaient jusqu'alors inefficaces. Le Sorafénib a permis, non pas de traiter mais, de limiter la progression du CHC. Cet inhibiteur multi-kinases (RAF kinase, VEGF-R1, -R2 et -R3, PDGFR- β , FLT3, C-KIT et RET) est une petite molécule qui a un double mécanisme d'action. Il bloque la prolifération des cellules cancéreuses par l'inhibition des récepteurs tyrosine-kinase KIT et FLT3 d'une part et il inhibe des sérine/thréonine kinases de la voie RAF/MEK/ERK d'autre part. Il exerce un effet anti-angiogénique en ciblant les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, par l'inhibition des récepteurs tyrosine-kinase et PDGFR- β (Song, 2009) d'une part et par l'inhibition de la

sérine/thréonine RAF de la voie RAF/MEK/ERK d'autre part. Il est donc **anti-tumoral** et **anti-angiogénique**.

La phase III de l'**essai SHARP** (Llovet et al, 2008) a montré une **augmentation de la survie** à 10,7 mois avec le Sorafénib contre 7,9 mois avec le placebo sur des cas de CHC avancés, prouvant son efficacité en dépit d'effets secondaires comme des diarrhées et le **syndrome main-pied** (Milano et al, 2009). L'**essai Asie-Pacifique** qui comprenait des malades plus atteints (30% avaient 4 sites tumoraux) a montré qu'une hypertension s'est ajoutée aux effets secondaires connus dans l'essai SHARP. Ces deux essais, réalisés avec succès, ont signé un progrès significatif du traitement du CHC avancé jusqu'alors incurable (Rosmorduc et al, 2010). Les perspectives proposées par Rosmorduc (2010) sont d'inactiver les voies dépendantes de Ras et de cibler en amont les récepteurs à l'EGF et au TGF α , en couplant le Sorafénib au gefitinib, à l'erlotinib, à la rapamycine (anti-prolifératif et anti-angiogénique) ou au bevacizumab (cible de l'angiogenèse en dépit de l'apparition d'une hypertension artérielle) ou encore à la doxorubicine proposée en chimiothérapie conventionnelle.

En parallèle de la néo-angiogenèse, les recherches cibleront également la lymphogenèse impliquée dans la dissémination.

- **L'immunothérapie** vise à stimuler les moyens de défense de l'organisme, qui pour des raisons variées, a perdu sa capacité à reconnaître les cellules tumorales et de ce fait ne peut plus assurer leur destruction, comme l'explique la revue de El-Hage sur la réponse immunitaire et le cancer (El Hage et al, 2008). Le CHC est une cible de l'immunothérapie car les traitements conventionnels sont peu efficaces et laissent place à des micrométastases et des récidives. De plus, il existe une réponse immunitaire anti-tumorale pré-existante. Les essais post-résection utilisant des lymphocytes T CD8 $^{+}$ (Takayama et al, 2000) et des lysats tumoraux (Kuang et al, 2004) ont eu un effet positif. L'immunothérapie pourrait apporter une nouvelle solution à travers l'application clinique de vaccins de peptides dérivés de NY-ESO-1 chez les patients HLA-A2 positifs (Bouet-Toussaint et al, 2008; Marotta et al, 2004; Toutirais et al, 2009). Des essais d'immunothérapie anti-tumorale sont en cours reposant entre autres sur la vaccination active, les cellules dendritiques maturées et chargées en antigène tumoral ou encore les interleukines. La preuve de ce concept a été apportée par les lymphocytes T humains Vgamma9Vdelta2 qui peuvent être activés par des antigènes et qui exercent une activité cytotoxique déterminante contre des types tumoraux sévères, incluant le CHC (Bouet-Toussaint et al, 2008; Toutirais et al, 2009). L'essai coordonné par Gourdonnay à Nantes a consisté à prélever le sang périphérique des patients, à faire maturer et charger les cellules dendritiques en peptides AFP et à les réinjecter. Le protocole parallèle, développé par le laboratoire INSERM U948 Biothérapies hépatiques, a consisté en la vaccination active de la protéine entière AFP dans des cellules musculaires, cette dernière étant véhiculée par un vecteur synthétique de type polymère appelé 704. La vectorisation a permis de réduire la dose d'ADN injectée tout en gardant une réponse immunitaire forte. La réduction du développement du CHC a confirmé que l'AFP est un bon antigène tumoral cible. Le projet de vectorisation d'ADN de l'AFP par le 704 est un bon candidat pour un essai clinique de phase I d'immunothérapie adjuvante en prévention de récurrence (Conchon, 3^{ème} Colloque Génomique Fonctionnelle du Foie, Rennes, 2010).

De nouvelles perspectives de recherche émergent parallèlement comme le projet d'essai clinique INCa-DHOS mené par V. Catros-Quemener et N. Ferry sur le carcinome hépatocellulaire.

(<http://biotherapies-innovantes.univ-rennes1.fr/> et <http://www.ifr26.nantes.inserm.fr>)

e. Le traitement préventif

Prévention primaire : vaccination contre l'hépatite B des sujets à risque, de l'environnement familial, identification chez les donneurs de sang des porteurs du VHC, lutte contre l'alcoolisme et dépistage et traitement de l'hémochromatose génétique.

Prévention secondaire : dépistage précoce du CHC chez les patients porteurs d'une hépatopathie chronique par le dosage systématique de l'alpha-foetoprotéine et pratique d'une échographie hépatique tous les 6 mois.

Malgré l'ensemble de ces thérapeutiques et les mesures de prévention, le pronostic du CHC reste redoutable avec survie rarement supérieure à 12 mois. La résection chirurgicale et la transplantation hépatique représentent le meilleur traitement des tumeurs hépatiques primitives, à condition de laisser suffisamment de parenchyme fonctionnel et de limiter le risque hémorragique. La mortalité opératoire est de l'ordre de 2 % sur un foie sain et de 5 % en cas de cirrhose. Pour les tumeurs non opérables et les récidives, la destruction percutanée par alcoolisation ou par radiofréquence, et la chimio-embolisation représentent des alternatives. Une absence de réponse à la radiothérapie et la chimiothérapie par voie générale est constatée.

Par conséquent, de nouvelles voies thérapeutiques sont recherchées permettant de détruire sélectivement les cellules cancéreuses en ciblant davantage la tumeur et en visant ses marqueurs spécifiques sans détruire les cellules saines.

A l'avenir, les perspectives s'appuieront sur le développement de combinaisons thérapeutiques. La thérapie génique et la thérapie protéique constituent une solution complémentaire prometteuse, comprenant également la vectorisation de principes actifs anti-cancéreux encapsulés dans des nanomédicaments (cf. Chapitre 3).

Chapitre 2.

Les modèles in vitro

I. Introduction

Si les modèles *in vivo* comme l'ablation partielle du foie chez le rat ou la souris reflètent des situations physiologiques ou physiopathologiques chez l'Homme, en pratique, ils ne permettent pas de répondre à toutes les questions scientifiques. Il est difficile d'utiliser exclusivement ce type de modèles pour aborder l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent les processus de différenciation, prolifération ou d'apoptose hépatocytaire. L'animal entier est par définition un système complexe sur lequel il est difficile d'interférer avec un ou plusieurs mécanismes moléculaires. Par exemple, il reste difficile de transfecter des cellules *in vivo*. Bien que l'avènement des techniques de transgénèse chez la souris ait permis de contourner beaucoup des limites *in vivo*, les modèles de cellules *in vitro* offrent des options expérimentales toujours énormément exploitées par presque toutes les équipes de recherche. De plus, l'expérimentation animale comporte des limitations financières d'une part et éthiques d'autre part.

Elaborée en 1959, la « **règle des 3 R** » (Réduire, Raffiner, Remplacer) constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, W.M.S. Russell et R.L. Burch ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites « humaines », appelé la « règle des 3 R » et comprenant les points suivants :

- **Reduce** (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation
- **Refine** (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou « end-points »)
- **Replace** (Remplacer) les modèles animaux

Dans le cadre de cette règle, les études sur les modèles *in vitro* prennent tout leur sens en limitant le recours aux modèles animaux.

Au cours des 30 dernières années, des modèles *in vitro* complémentaires des modèles *in vivo*, ont été développés, en conservant dans la mesure du possible les fonctions spécifiques des cellules différenciées tout en proposant des systèmes en culture qui permettent de réduire la complexité et d'interférer plus directement avec le fonctionnement des cellules étudiées par l'adjonction de traitement ou par modulation des conditions de culture. Les modèles *in vitro*, regroupant les cellules en suspension et en culture, sont utilisés universellement dans les laboratoires de recherche fondamentale ou appliquée pour les études portant sur la **différenciation, prolifération, le métabolisme, la toxicité, ou encore l'apoptose**. La compréhension des mécanismes est d'autant plus importante lorsqu'il s'agit d'un organe comme le foie qui se distingue par plus de 500 fonctions, incluant le métabolisme des protéines, des hydrates de carbone, et des lipides, la détoxification des composés endogènes et exogènes, la production de la bile pour la digestion, et la sécrétion de nombreux protéines sériques (albumine, facteurs de coagulation).

Concernant les hépatocytes, de multiples systèmes de culture de cellules humaines ou animales existent présentant des caractéristiques de différenciation et prolifération très variables (Guillouzo & Guguen-Guillouzo, 2008). Il est possible de distinguer plusieurs grandes catégories en partant de deux statuts histologiques hépatiques différents : les cellules isolées à partir de tissus histologiquement normaux et celles isolées à partir de tumeurs, en particulier les carcinomes hépatocellulaires. A partir de ces deux « entrées », de nombreux modèles de cellules hépatiques peuvent être déclinés (figure 63). Ils incluent les cultures primaires, les cellules immortalisées et transformées génétiquement non modifiées ou modifiées par transfert de gènes.

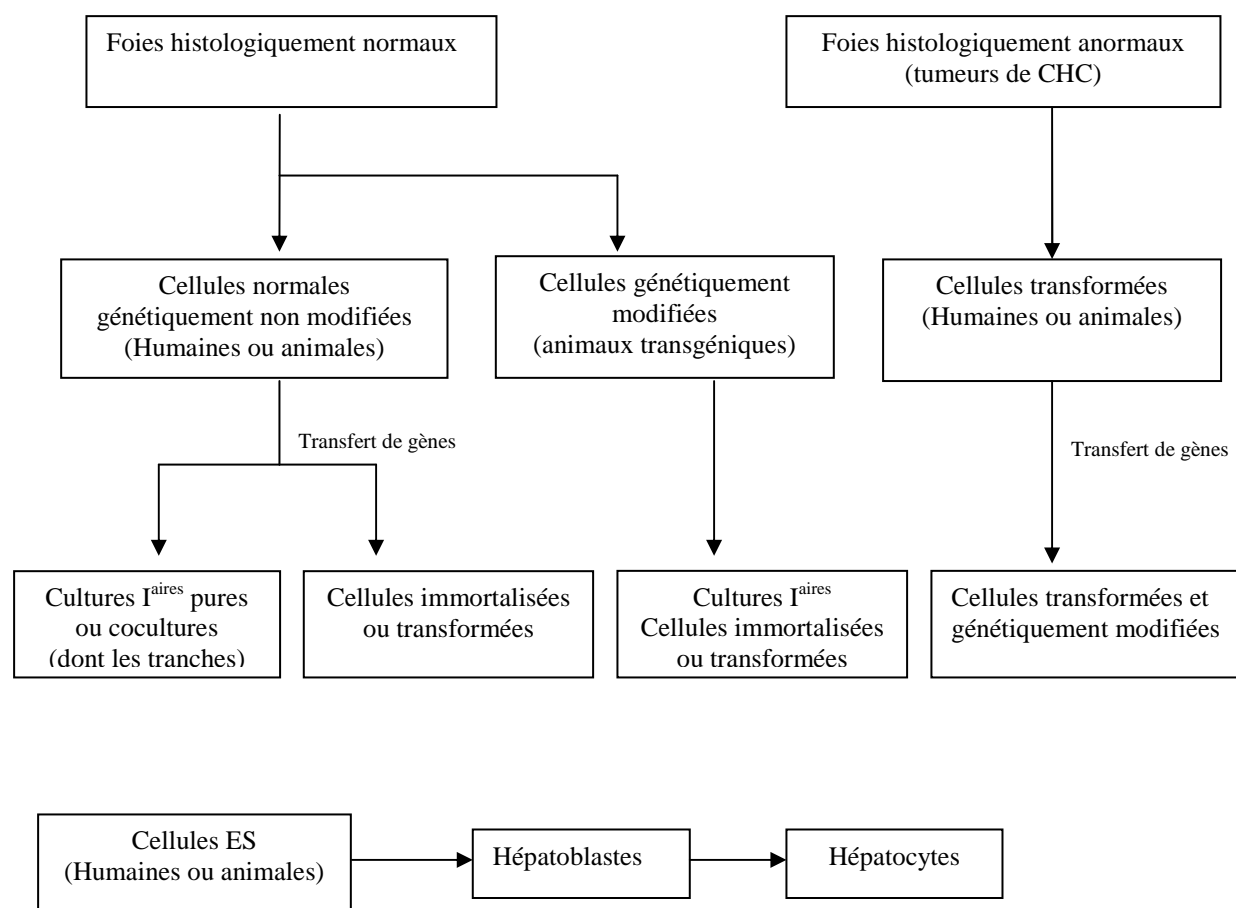


Figure 63. Modèles cellulaires hépatiques.

Les avantages et les limites des différentes préparations de foie *in vitro* sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (figure 64).

Model	Advantages	Limitations
Isolated perfused liver	Functions close to those of the <i>in vivo</i> organ (all enzyme equipment preserved) Lobular structure preserved Functional bile canaliculi Collection of bile possible Short-term kinetic studies (extraction)	Short-term viability (2–3 hr) Study of one or a few compounds only Bile excretion decreased after 1 to 3 hr No study on human liver Suitable only for liver of small animals No significant reduction in the number of animals used
Liver slices	Lobular structure preserved (all enzyme equipment preserved) Selective intralobular effects detectable Studies on human liver possible Studies on several compounds at different concentrations	Viability: 6 hr to 2 days No collection of bile possible Not all the cells preserved similarly (interassay variability)
Isolated hepatocytes ^a	Obtained from whole livers or wedge biopsies Functions close to those of <i>in vivo</i> hepatocytes Studies on several compounds at different concentrations Interspecies studies Representative of different lobular subpopulations Cryopreservation	Short-term viability (2–4 hr) No bile canaliculus
Primary hepatocyte cultures ^a	Functions expressed for several days in certain conditions Induction/inhibition of drug metabolizing enzymes Interspecies studies	Early phenotypic changes Altered bile canaliculi
Liver cell lines	Unlimited cell number Some functions preserved	Various drug enzyme activities lost or decreased Genotype instability
Subcellular fractions S9000 × g fraction Microsomes	Drug enzyme activities preserved Drug enzyme activities preserved Production of metabolites for structural analysis	Short-term studies Short-term studies No cytosolic phase II enzyme reactions Cofactors required for activity
Genetically engineered cells	One or more human enzymes expressed Available mainly for CYPs Unlimited cell number	Use for specific purposes only No physiologic levels of enzymes

^aOther cell types, e.g., Kupffer, endothelial, stellate, and bile duct cells, can also be isolated, cultured, and even cocultured with hepatocytes.

Figure 64. Avantages et limites des préparations de foie *in vitro* (Guillouzo, 1998).

A côté des hépatocytes en culture primaire et des lignées cellulaires hépatiques transformées, les **cellules souches** isolées soit d'embryons soit de tissus adultes ou bien obtenues en reprogrammant des cellules somatiques sont en train d'émerger en tant que nouvelle source potentielle d'un nombre illimité d'hépatocytes. Actuellement, seules les cellules ayant un profil hépatocytaire (hépatoblastes) exprimant de faibles niveaux de marqueurs spécifiques du foie, à part les enzymes du métabolisme des drogues et de détoxification, sont obtenues. Elles ne sont pas encore appropriées en tant que cellules métaboliquement compétentes pour les études de toxicité.

Les modèles in vitro sont incontournables de par leurs nombreux atouts. Essentiels pour la recherche fondamentale, ils permettent la **miniaturisation** des systèmes, la **reproductibilité**, la **diminution des coûts** par rapport aux modèles in vivo, l'**étude des gènes** par la **surexpression** et l'**inhibition** de leur expression, le **transfert de gènes**, l'étude de la **structure et de la fonction des ARNm et des protéines**, le **criblage** pour tester des molécules notamment à visée thérapeutique, l'étude de nouvelles **interactions cellulaires** et **moléculaires**, le développement de **thérapies cellulaires** (notamment l'immunothérapie cellulaire), l'étude du **cycle cellulaire**, le travail sur un type de cellules particulier (hépatocytes) ou sur plusieurs types cellulaires en co-culture. Les modèles in vitro permettent également de mettre en œuvre toutes les nouvelles approches de la biomédecine comme les **techniques dites « omiques »**, notamment la transcriptomique et la protéomique ouvrant de nouvelles perspectives d'applications bio-médicales.

II. Cultures primaires d'hépatocytes

L'acquisition des connaissances sur le métabolisme des drogues est une étape nécessaire dans le développement pharmaceutique de nouveaux composés (Guillouzo & Guguen-Guillouzo, 2008). Les hépatocytes humaines en culture primaire sont considérés comme un modèle cellulaire de référence (Guguen-Guillouzo et al, 1986), car ils expriment la majorité des enzymes du métabolisme des drogues, répondent aux inducteurs d'enzymes et sont capables de générer in vitro un profil métabolique similaire à ce qui est retrouvé in vivo (Castell et al, 2006). Les hépatocytes sont le modèle le plus approprié des corrélations entre toxicité et métabolisme, les mécanismes d'hépatotoxicité (Gomez-Lechon et al, 2003).

1. Biopsies chirurgicales et perfusion de foie pour l'isolement des hépatocytes

Le tissu hépatique peut être requis pour poser un diagnostic et un pronostic par l'étude anatomopathologique d'une biopsie du foie, notamment pour les tumeurs. Il s'agit d'une résection hépatique sur tumeur avérée. Le tissu hépatique prélevé est situé dans la lésion tumorale mais également en dehors. A partir de « déchets post-opératoires », il est possible d'isoler des hépatocytes humains « normaux ». Les biopsies chirurgicales perfusables, réalisées à la demande d'un diagnostic, constituent la méthode qui permet d'isoler des hépatocytes et d'obtenir des cultures primaires humaines.

2. Culture pure

Une fois isolés, les hépatocytes humains en culture pure ne se divisent pratiquement pas. Les hépatocytes de rat ou de souris se divisent une ou deux fois puis s'engagent vers l'apoptose (Gilot et al, 2002a). Leur survie est donc courte et les fonctions différenciées disparaissent rapidement après la mise en culture. Cependant, sur de courtes durées de culture, ces cellules constituent des modèles pertinents pour des études de pharmacotoxicologie, de cycle cellulaire et d'engagement vers l'apoptose.

Des améliorations ont été apportées par l'apport de facteurs solubles (DMSO, insuline, glucocorticoïdes, principalement), de facteurs matriciels comme le matrigel mais surtout des interactions cellulaires. Les interactions ont permis de faire évoluer les modèles in vitro de culture primaire et notamment les interactions entre hépatocytes et cellules biliaires à l'origine du système de co-culture initiée par C. Guguen-Guillouzo (Guguen-Guillouzo et al, 1983).

3. Co-culture

Les hépatocytes isolés par dissociation enzymatique du foie adhérent afin de survivre plus de quelques heures. Dans les conditions de culture conventionnelles, ils perdent rapidement leurs fonctions hautement différenciées. Ainsi, la régulation des fonctions hépatiques, notamment les activités enzymatiques, ne peuvent être étudiées au-delà de quelques jours. Le problème peut être surmonté en mimant les interactions cellulaires spécifiques in vivo. Ainsi, en co-cultivant avec des cellules épithéliales biliaires, les hépatocytes adultes gardent la capacité de synthétiser de hauts niveaux d'albumine et de conjuguer les drogues. Dans ces conditions, les cellules sécrètent un abondant matériel hétérogène extracellulaire. Les co-cultures peuvent être maintenues dans un milieu sans sérum et les fonctions spécifiques du foie pourront être modifiées expérimentalement. Un tel modèle est approprié à la modulation des activités enzymatiques du foie selon des conditions expérimentales définies (Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 1983). De plus, notre équipe a également établi des conditions de culture permettant la prolifération des hépatocytes en co-culture par l'ajout de combinaison de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance permettant la prolifération d'hépatocytes adultes différenciés dans un modèle qui mime la régénération du foie (Serandour et al, 2005).

III. Lignées d'hépatomes

Les hépatocytes en culture primaire montrent une instabilité phénotypique et présentent une accessibilité restreinte. Différentes alternatives ont été explorées au cours des dernières années pour surmonter les limitations des hépatocytes primaires. Cela inclut l'immortalisation de cellules hépatiques humaines adultes ou fœtales en transduisant des gènes de virus tumoraux et des oncogènes. De plus, diverses lignées ont été établies à partir de l'expansion de cellules isolées de tumeurs hépatiques. Ces lignées présentent des degrés variables de différenciation qui ont conduit diverses équipes à tenter d'augmenter l'expression des enzymes du métabolisme des drogues dans ces lignées cellulaires par surexpression de gènes contrôlant la différenciation hépatocytaire ou de fonctions hépato-spécifiques particulières (Castell et al, 2006; Gomez-Lechon et al, 2003).

1. Lignées d'hépatomes obtenues à partir de biopsies de CHC

Plusieurs lignées d'hépatomes ont été dérivées à partir de fragments de biopsies de tumeurs primaires. Les **lignées issues d'hépatomes humains** les plus couramment utilisées (Donato et al, 2008; Gomez-Lechon et al, 2001) sont :

- **HuH7** (Nakabayashi et al, 1982)
- **HepG2 et Hep3B** (Aden et al, 1979)
- **Hep40** (Bouzahzah et al, 1995)
- **PLC/PRF/5** (MacNab et al, 1976)
- **HBG** (Glaise et al, 1998) illustrée figure 65.

De nombreuses études comparent les lignées (Jabari et al, 2009) quant à leur niveau d'expression des marqueurs hépato-spécifiques. Par exemple, les cellules HepG2 expriment l'albumine, la macroglobuline α_2 , l'antitrypsine α_1 , l'antichymotrypsine α_1 , la

transferrine, l'haptoglobine, les compléments C3 et C4 (mais pas la globuline Gc) mais très peu d'enzymes de biotransformation.

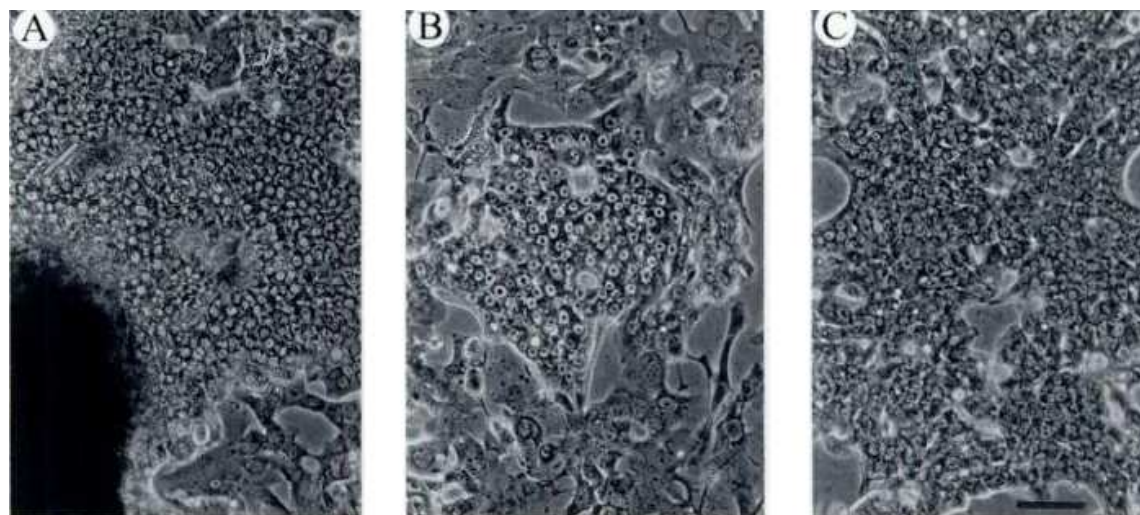


Figure 65. Etablissement de la lignée HBG au laboratoire.

Photographie A : la zone sombre représente un fragment de biopsie du CHC qui a permis d'établir cette lignée. Diverses populations cellulaires ont émergé conduisant à isoler des cellules de morphologie hépatocytaire (photographies B et C). Plusieurs de ces populations ont donné des clones qui présentent un bon niveau de différenciation hépatocytaire.

Les « qualités » des lignées sont donc estimées selon le nombre de marqueurs fonctionnels hépatocytaires exprimés (synthèse et sécrétion de protéines par rapport aux hépatocytes normaux), leur prolifération et leur degré de transformation (croissance en soft agar, développement de tumeurs chez la souris Nude, altérations caryotypiques). Globalement, l'ensemble de ces lignées possède quelques caractéristiques de différenciation qui ont permis d'étudier des régulations de gènes. Cependant, ces modèles présentent des niveaux de différenciation qui limitent leur utilisation notamment en pharmacotoxicologie.

2. Lignées d'hépatomes humains immortalisées artificiellement

Des lignées cellulaires humaines ont également été obtenues par immortalisation de cellules normales en utilisant des gènes transformants tels que **l'Antigène T** du virus SV40 (Pfeifer et al, 1993). Ces dernières ont montré des niveaux de différenciation initialement corrects mais leur stabilité phénotypique s'est révélée médiocre et ces modèles ne constituent pas des outils de référence en hépatologie.

IV. La lignée HepaRG

1. Description

La lignée tumorale d'hépatome humain, appelée **HepaRG (Rumin Gripon)** a été établie au laboratoire INSERM U522 (Gripon et al, 2002). Il s'agit de cellules de type **épithélial** à haut potentiel prolifératif, capables d'effectuer un programme très complet de **différenciation** hépatocytaire. Elles sont douées de propriétés de **cellules progénitrices bipotentes** au stade prolifératif, ce qui se traduit par l'apparition de deux populations à confluence, l'une hépatocytaire formant des colonies entourées par l'autre population de type épithélial biliaire (figure 66). En outre, elles ont la propriété de **transdifférenciation** (Cerec et al, 2007). Toutes ces propriétés expliquent la nécessité de protéger cette lignée par un brevet Inserm (Brevet INSERM N°FR 01 99 044).

La lignée a été obtenue par croissance spontanée d'une culture primaire d'un carcinome hépatocellulaire humain (dérivé d'une infection chronique du **virus de l'hépatite C**), différenciée au **stade I** dans la classification d'Edmonson (Annexe 2). Les cellules de cette lignée présentent un caractère bipotent. A faible densité, les progéniteurs prolifèrent activement, cependant dès quelques jours après repiquage, des marqueurs d'engagement dans la différenciation hépatocytaire sont détectés (Cerec et al, 2007). A confluence, les cellules cessent de se diviser pour poursuivre une différenciation en deux types cellulaires distincts, les hépatocytes et les cellules biliaires, similaires à celles présentes dans le foie. Les caractéristiques morphologiques de cette lignée sont présentées sur les photos en contraste de phase prises au cours du processus de différenciation (Cerec et al, 2007). De façon analogue à une culture d'hépatocytes fraîchement isolés, les canalicules biliaires formés au sein des îlots d'hépatocytes se repèrent également par la réfringence de ces petites structures entre les hépatocytes, dans une culture différenciée de cellules HepaRG. Les hépatocytes binucléés sont aussi présents dans les cultures d'HepaRG différenciées maintenues à long terme.

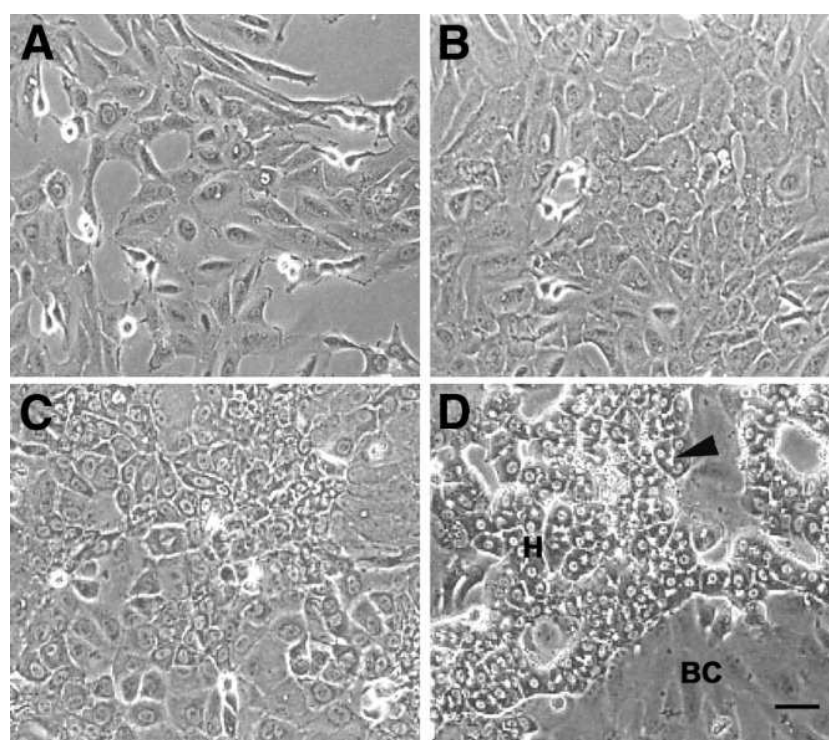


Figure 66. Morphologie des cellules de la lignée HepaRG en culture observée en contraste de phase pendant la différenciation : Cellules HepaRG non différenciées, en prolifération à J2 (A), tapis monocouche de cellules jointives à J5 (B), cellules à confluence à J15 (C), différenciation à 30 jours de culture dont les 15 derniers en présence de DMSO 2% (D) en deux types cellulaires : les hépatocytes (H) et les cellules biliaires (BC : *biliary cells*), similaires à celles présentes dans le foie. La barre correspond à 60 μ m. La pointe de la flèche indique la structure des canalicules biliaires. (Cerec et al, 2007).

Cette lignée HepaRG, couverte par un brevet international, est proposée par la société Biopredic International sous la forme de plaques multipuits prêtes à l'emploi. C'est une alternative simple et pertinente à l'utilisation de cellules primaires issues directement d'un tissu hépatique. C'est le cas en recherche fondamentale, notamment pour la mise en évidence de nouvelles régulations de gènes non décrites dans les autres lignées hépatiques, car non exprimées, à l'aide de puces à ADN.

Après 2 semaines de confluence, la lignée présente un niveau de différenciation plus élevé en présence de DMSO et d'hydrocortisone que les autres lignées dérivées d'hépatocarcinome (Gripon et al, 2002). Cette lignée est infectable par le **virus de l'hépatite B** (VHB)(Gripon et al, 2002; Hantz et al, 2009).

Outre la caractéristique morphologique, l'état différencié des cellules HepaRG a été évalué en détectant des ARNm spécifiques du foie, tel l'ARNm de l'**albumine**, la **transferrine**, l'**aldolase B** (enzyme glycolytique), et des enzymes de détoxification (**CYP 2E1**, **CYP 3A4** et **GST α**), tous étant exprimés dans les hépatocytes adultes. L'**alphafoetoprotéine** (AFP) est un marqueur des hépatocytes fœtaux. Par rapport aux autres cellules hépatocytaires, les cellules HepaRG ont conservé le métabolisme des xénobiotiques, du fer et des lipides et expriment les transporteurs fonctionnels, permettant ainsi à l'utilisateur de tester simultanément l'effet d'une drogue et de ses métabolites. Cette lignée exprime les enzymes phase I dont celles de la famille du cytochrome P450 (CYP 1A2, 2C9, 2D6, 2E1 et 3A4) et de phase II (GSTA1, GSTA4, GSTM1 et UGT1A1), divers facteurs de transcription ainsi que d'autres fonctions spécifiques du foie, qui se sont avérées plus représentatives des hépatocytes normaux in vivo par rapport à la lignée HepG2. Ces marqueurs hépatocytaires sont exprimés à des niveaux comparables à ceux des hépatocytes humains fraîchement isolés (Aninat et al, 2006).

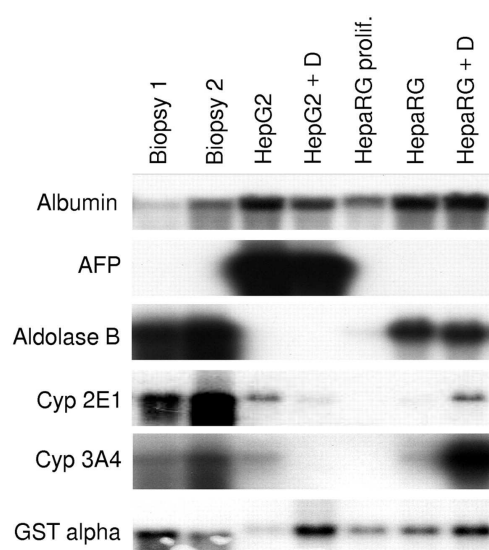


Figure 66 bis. Expression des fonctions spécifiques du foie des cellules HepaRG. Analyse par Northern-blot de l'expression des ARNm spécifiques du foie dans deux biopsies, les cellules HepG2 et les cellules HepaRG. Les cellules cultivées sont maintenues soit à confluence 1 mois soit en conditions de prolifération (prolif). Un traitement de DMSO 2% est appliqué les 15 derniers jours de la culture quand c'est indiqué (+D) (Gripon et al, 2002)

En conclusion, les cellules de HepaRG constituent un substitut de qualité aux hépatocytes humains pour des études du métabolisme et de la toxicité des drogues, comme l'aflatoxine B1, et notamment celles qui sont métabolisées par les CYP pour exercer leurs effets thérapeutiques et/ou toxiques (Guillouzo et al, 2007). Au regard de la stabilisation et du maintien de la culture de la lignée à long terme, elle est également un modèle pour l'étude de la toxicité chronique (Josse et al, 2008).

2. Culture des cellules HepaRG

Les **cellules en prolifération** sont cultivées dans des flasques stériles de 75cm² (à 37°C avec 5% de CO₂ ambiant) dans du milieu de culture William's E complété par :

- L-Glutamine : 2 mM
- Insuline : 5 µg/µl
- Hydrocortisone hémisuccinate : 10⁻⁵ M
- Sérum de veau fœtal (SVF) : 10%
- Antibiotiques : Pénicilline (100 Unités/ml) et streptomycine (100µg/ml).

L'**insuline** augmente l'attachement et la survie des cellules, en activant la synthèse protéique et en régulant des fonctions spécifiques comme le métabolisme des lipides et des carbohydrates.

Les **glucocorticoïdes** favorisent la formation des canalicules biliaires, la production d'albumine et la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire. Ils exercent par conséquent un effet positif dose-dépendant sur la survie et la fonction des hépatocytes.

L'**hydrocortisone** est ajoutée à haute concentration afin d'augmenter la stabilité phénotypique de la lignée et la capacité de différenciation.

Le **SVF** apporte des facteurs de croissance aux cellules.

Les cellules en voie de différenciation sont cultivées pendant 15 jours au terme desquels un ajout de **DMSO** (DiMéthyl SulfOxide) à hauteur de 2 % sur les cellules confluentes stabilise leur potentiel de différenciation, leur morphologie hépatocytaire et favorise la présence de canalicules biliaires. Il renforce l'expression des fonctions hépatocytaires, la survie et la résistance à l'apoptose et inhibe la prolifération. Le DMSO est un solvant dipolaire également connu pour sa fonction hépatoprotectrice in vivo.

Les cellules sont entretenues par un **changement de milieu 3 fois par semaine** et un **repiquage tous les 15 jours** (quand les cellules sont arrivées à confluence), à raison de 2 millions de cellules comptées par flasque de 75 cm², suivi d'un changement de milieu le lendemain.

3. Protocole du décollement sélectif

Décollement de cellules HepaRG progénitrices :

- 1 Lavage PBS
- Trypsine EDTA (1ml), incubation 5 min à 37°C
- Reprise par milieu 10% SVF

Décollement sélectif d'hépatocytes des cultures de cellules HepaRG différenciées :

- 2 Lavages PBS
- Trypsine EDTA dilué au ½ (5ml)
- Incubation à RT 5 min
- Agitation pour décoller les colonies d'hépatocytes arrondies
- Reprise par milieu 10% SVF + 2% DMSO
- Centrifugation 1500 rpm 2 min
- Ensemencement dans milieu 10% SVF + 2% DMSO

Les photographies illustrent les étapes depuis une culture différenciée (figure 67).

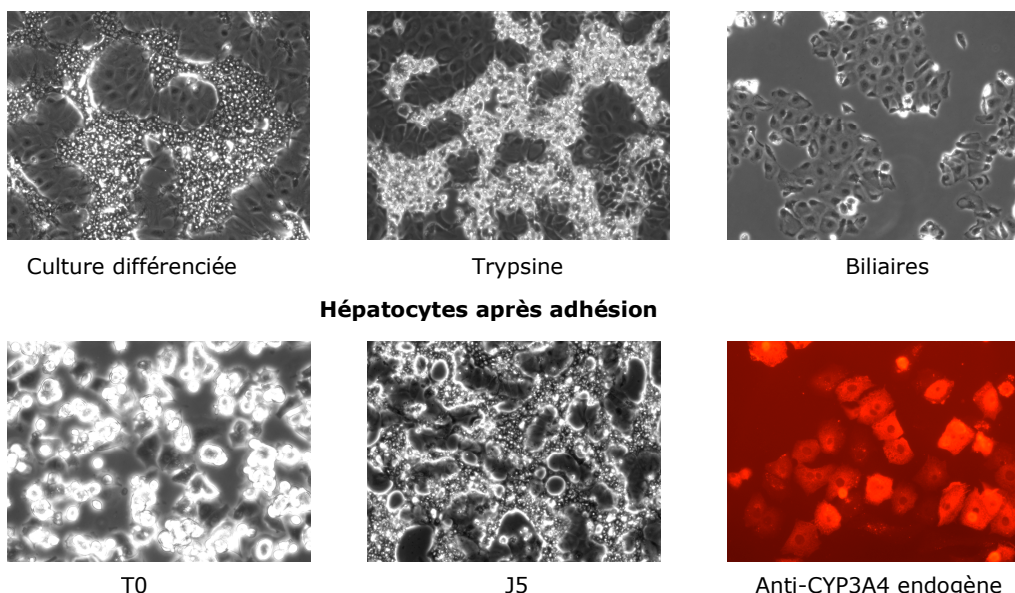


Figure 67. Suivi du décollement sélectif d'une culture différenciée HepaRG.

Chapitre 3.

Vectorisation non virale : méthodes et applications

I. Revue des méthodes de vectorisation

1. Généralités

La **vectorisation** correspond au transfert de **bio-molécules ou de principes actifs** vers des **cellules in vitro ou in vivo**. Lorsqu'il s'agit de gènes, la technique est appelée transfert de gènes qui a pour but d'introduire un ADN étranger dans une cellule. Le gène étranger introduit dans les cellules est nommé transgène. Si le transfert de gènes n'a pas de but thérapeutique, il n'est pas à considérer comme une thérapie génique. Le transfert de gènes est une opération qui consiste à introduire un gène ou un ADNc cloné dans une cellule receveuse en suivant diverses étapes : la préparation du gène, l'intégration du gène dans un vecteur d'expression, le transfert proprement dit à la cellule receveuse et sa détection. Sa finalité n'est donc pas nécessairement thérapeutique (Bitar, Terminologie de la thérapie génique, 2001)(Annexe 3).

Le projet d'introduire un gène ou une séquence d'ADN dans des cellules en culture est né suite à l'identification de sa structure, à la compréhension de l'organisation fonctionnelle des gènes et au séquençage du génome humain. Le **transfert de gènes** (figure 68) est devenu une technologie courante dans le domaine de la recherche biologique.

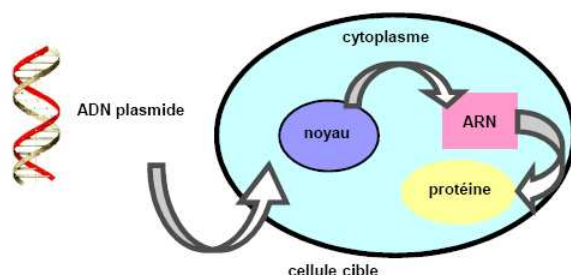


Figure 68. Principe du transfert de gènes. L'ADN est ici un plasmide d'expression eucaryote.

Le transfert de gènes a d'abord trouvé ses applications in vitro. En surexprimant ou en inhibant **l'expression d'une protéine** donnée, il est envisageable d'en **étudier le rôle** dans un contexte cellulaire adapté comme une lignée cellulaire. Cette technologie s'est également présentée comme un outil de biotechnologie afin de produire des **protéines recombinantes** qui, après purification, peuvent être utilisées dans des tests in vitro acellulaires, dans des tests sur cellules en culture ou à des fins thérapeutiques (Dobson, 2006; Gupta & Lee, 2007; Pankhurst, 2003). In vivo, le transfert de gènes a des applications médicales connues sous le nom de **thérapie génique**, développée dans le Chapitre II sur les applications.

La première difficulté du transfert de gènes réside dans le franchissement de la membrane plasmique des cellules cibles par le «gène d'intérêt», généralement un ADN complémentaire, inséré dans un plasmide dérivé des plasmides bactériens. En effet, l'**ADN, macromolécule anionique et hydrophile**, n'est pas prédisposé à pénétrer les **membranes hydrophobes**. Il apparaît donc nécessaire de l'associer à une molécule facilitant le passage transmembranaire, un véhicule appelé **vecteur**.

Le terme de **vecteur** ne recouvre pas le même sens en biologie (vecteur d'expression plasmidique) qu'en chimie (molécule de transport capable de protéger et de transporter des acides nucléiques ou des biomolécules).

La première méthode de transfert de gène à être utilisée fut la précipitation au phosphate de calcium (Graham & van der Eb, 1973), qui mimait, une fois complexé à de l'ADN, une structure nucléosomique, susceptible d'être phagocytée par les cellules.

Depuis, de nombreuses molécules, en particulier des polymères ou des lipides cationiques, naturels ou synthétiques, ont été créées pour permettre à l'ADN de franchir les membranes cellulaires (Thèse Leblond, 2005).

La **vectorisation** peut véhiculer différentes molécules, dont des acides nucléiques (ADN, ARNm, siRNA, shRNA), des peptides ou des protéines mais également des médicaments comme des drogues anticancéreuses et cela in vitro ou in vivo. La vectorisation englobe tous les processus mis en jeu pour le transport de ces biomolécules en les protégeant de la dégradation et en contrôlant leur libération dans le temps et l'espace.

La vectorisation d'ADNc a pour objectifs de :

- Délivrer l'ADN au sein de la cellule, ce qui nécessite de franchir la membrane plasmique
- Protéger l'ADN jusqu'au site d'action, comprenant la translocation nucléaire
- Cibler une population cellulaire, par le greffage d'un ligand

Le vecteur idéal doit répondre à ces critères :

- Facilité de production
- Production stable de la molécule introduite
- Absence d'immunogénicité, permettant des administrations répétées
- Tissu ou cellule-spécifique
- Transport d'acides nucléiques sans limite de taille
- Intégration non aléatoire dans le génome
- Entrée et expression dans les cellules en division et quiescentes

Le transport d'acides nucléiques repose sur **trois types de méthodes, physiques, chimiques et biologiques** (figures 69, 70). Les approches physiques regroupent la micro-injection, l'électroporation, la biolistique et les ultrasons. Les méthodes chimiques utilisées sont la précipitation, les lipides anioniques et cationiques, et les polymères. Enfin, les vecteurs biologiques font référence aux vecteurs viraux : adénovirus, virus adéno-associés (AAV), rétrovirus, herpès virus.

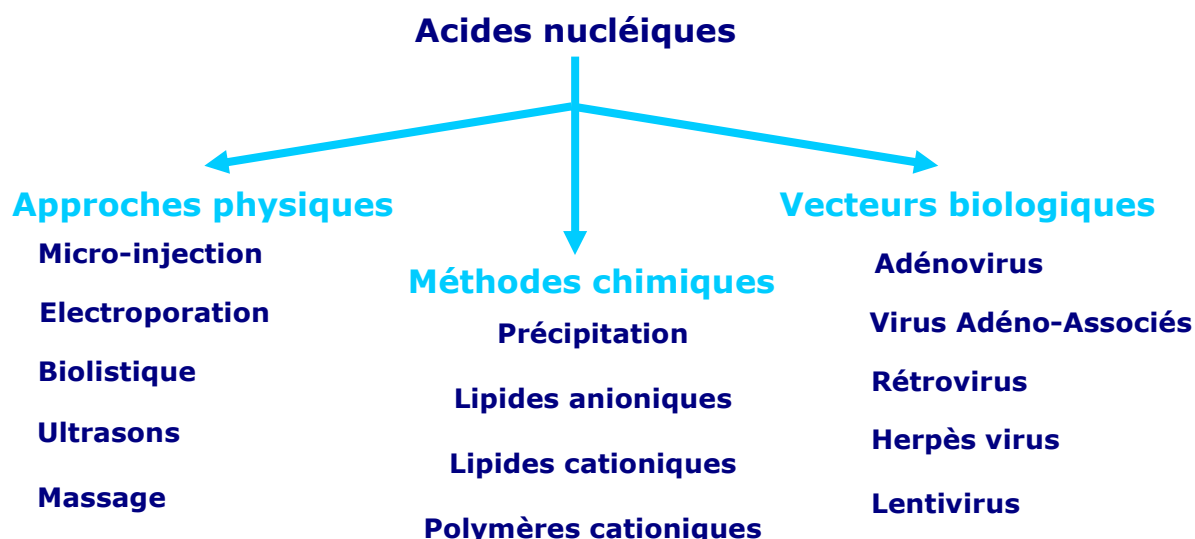


Figure 69. Méthodes physiques, chimiques et biologiques pour le transfert de gènes.

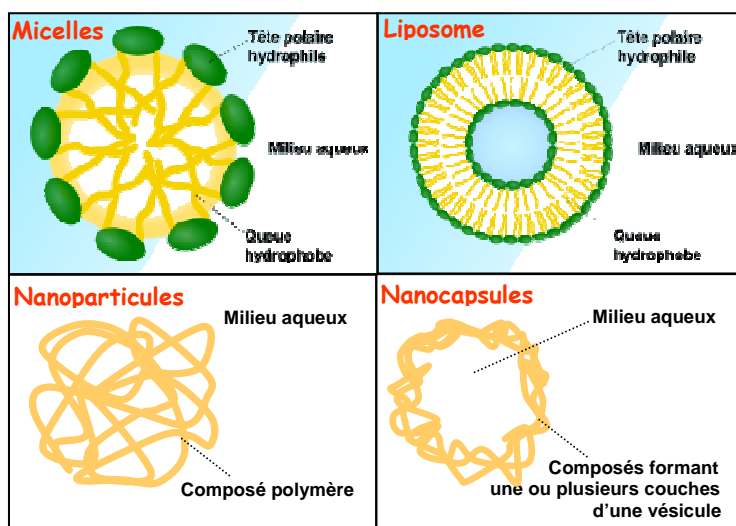


Figure 70. Détail des différentes classes de vecteurs synthétiques. Les micelles et liposomes sont composés de têtes polaires hydrophiles et de queues hydrophobes. Les nanoparticules sont formées de composés polymères, le milieu aqueux étant externe, tandis que les nanocapsules renferment du milieu aqueux en leur centre.

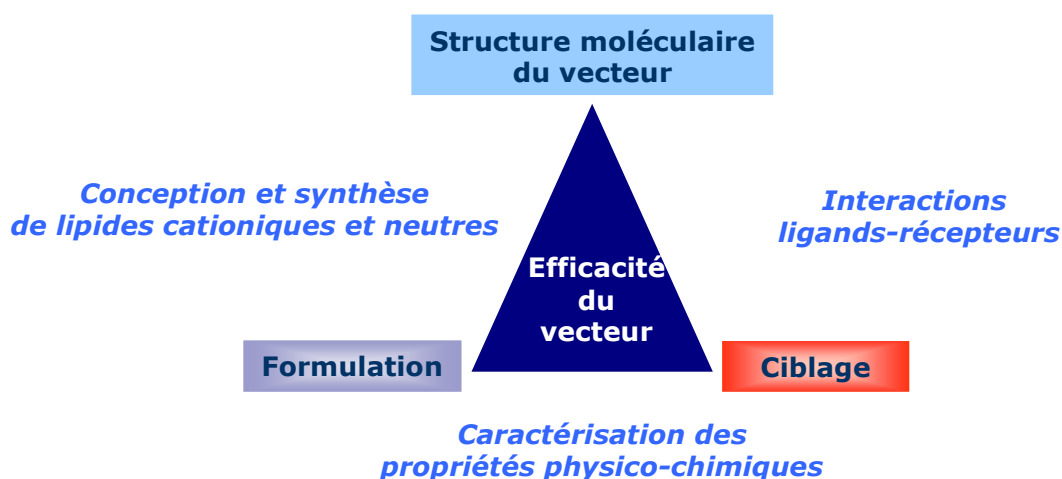


Figure 71. Critères de l'efficacité du vecteur.

D'après Montier, Gen2Bio, les rencontres Biotech de Biogenouest, St-Malo, 2010.

L'efficacité du vecteur (figure 71) est définie par sa **structure moléculaire**, sa **formulation**, son **ciblage**, ce qui nécessite respectivement la conception et la synthèse de lipides cationiques et neutres, la caractérisation des propriétés physico-chimiques et des interactions ligands-récepteurs.

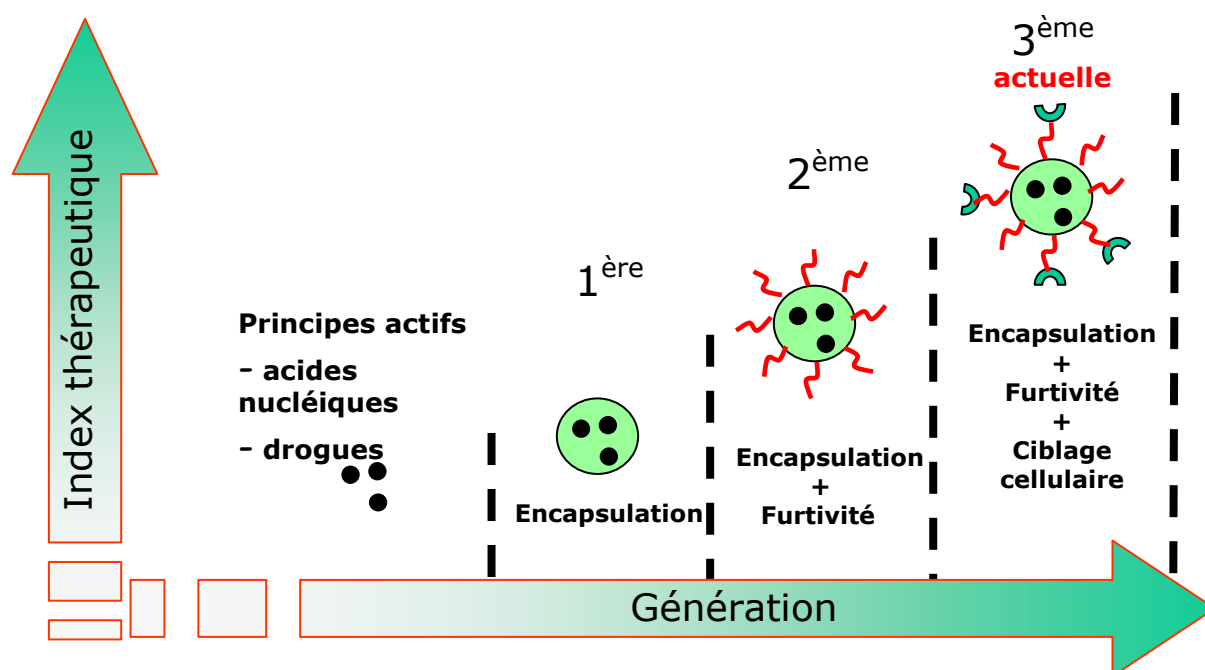


Figure 72. Evolution des vecteurs.

La vectorisation a beaucoup évolué en quelques années (figure 72). Les **principes actifs** que sont les **acides nucléiques** et les **drogues** ont d'abord été appliqués seuls puis ils ont été **encapsulés** dans des vecteurs pour constituer la première génération de vecteurs. Des éléments de **furtivité** tels que le PEG ont été ajoutés afin de permettre au couple vecteur-principe actif d'échapper au système immunitaire (2^{ème} génération). Des **ligands** permettant le **ciblage** des cellules, tels AF-20 pour le carcinome hépatocellulaire (Moradpour et al, 1995), décorent les vecteurs pour constituer, actuellement, la 3^{ème} génération de vecteurs. La spécialisation des vecteurs permet d'accroître l'index thérapeutique, en fonction de la génération de vecteurs.

2. Les vecteurs viraux

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des méthodes chimiques et physiques de transfert de gènes et de drogues anticancéreuses, c'est la raison pour laquelle les vecteurs viraux ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Cependant, il faut souligner que les vecteurs viraux sont les vecteurs les plus couramment utilisés en thérapie génique (Site des essais cliniques de thérapie génique <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>) en raison de leur efficacité très élevée par rapport aux lipides cationiques (500 fois moins efficaces in vivo par rapport aux virus).

Les cinq grandes classes de virus recombinants modifiés, oncorétrovirus, lentivirus, adénovirus, virus associés aux adénovirus AAV et herpes simplex virus, sont généralement mutés de façon à supprimer la réplication virale (Annexe 4).

Ils présentent en effet l'avantage d'un important potentiel de transfection mais comportent des inconvénients comme la taille limitée du transgène, la difficulté d'une production en masse en raison de son coût, une réponse immunitaire de la part de l'hôte, le risque d'une intégration non contrôlée dans le génome hôte (Cavazzana-Calvo et al, 2010; Fischer et al, 2001; Hacein-Bey-Abina et al, 2003). L'exemple est illustré par l'apparition de cinq cas de leucémie aiguë lymphoblastique chez les enfants atteints de DICS-1 survenus au cours des essais de Paris et de Londres en 1999, ce qui a conduit à l'interruption de ces derniers en 2005 (Cavazzana-Calvo et al, 2010; Fischer et al, 2001; Hacein-Bey-Abina et al, 2003).

Cependant, les vecteurs viraux ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans diverses pathologies génétiques, comme en témoigne l'essai sur l'amaurose congénitale de Leber qui atteint la rétine qui a permis de corriger la vue chez le chien en ayant utilisé un adéno-virus associé (Simonelli et al, 2010). Un essai clinique chez l'Homme est actuellement à l'étude par l'équipe de Fabienne Rolling dans le laboratoire de thérapie génique du CHU de Nantes, utilisant le même transgène mais pas le même sérotype ni la même construction du vecteur (Plate-forme de production de vecteurs viraux de transfert de gènes - INSERM U649, www.vectors.nantes.inserm.fr). Ce projet est d'autant plus encourageant que la séparation des capsides vides est désormais réalisable techniquement, les capsides virales vides étant responsables de l'immunogénicité.

Des résultats sont également attendus pour certaines maladies lysosomales avec atteinte du système nerveux central comme la maladie de Hurler où l'enzyme alpha-L-iduronidase fait défaut (Moullier et al, 1996). Des résultats prometteurs ont été obtenus sur le chien (Ciron et al, 2006) et des essais de non toxicité ont été menés sur les primates (Ciron et al, 2009).

Par ailleurs, la vectorisation virale est testée dans de nombreux protocoles de thérapie des cancers (immunothérapie, gènes suicides, ...).

3. Méthodes physiques

Les techniques physiques permettent d'injecter de l'ADN nu dans des cellules isolées ou dans un organisme entier (figure 73). La biolistique, les ultrasons, le laser et la magnétofection en sont quelques exemples comme le montre la figure, mais la méthode physique qui reste la plus utilisée est l'électroporation. Depuis le premier succès *in vitro* de Potter en 1984 (Potter et al, 1984), cette méthode efficace consiste en la diffusion passive d'ADN à travers des micropores membranaires créés par l'application de courtes impulsions électriques perméabilisant les membranes. Cette méthode apparaît comme une réelle alternative aux vecteurs viraux et à la transfection par les liposomes et polymères. Cependant, sa mise en œuvre demande un matériel spécifique, contrairement aux vecteurs qui ne nécessitent qu'une simple injection (Thèse Leblond, 2005).

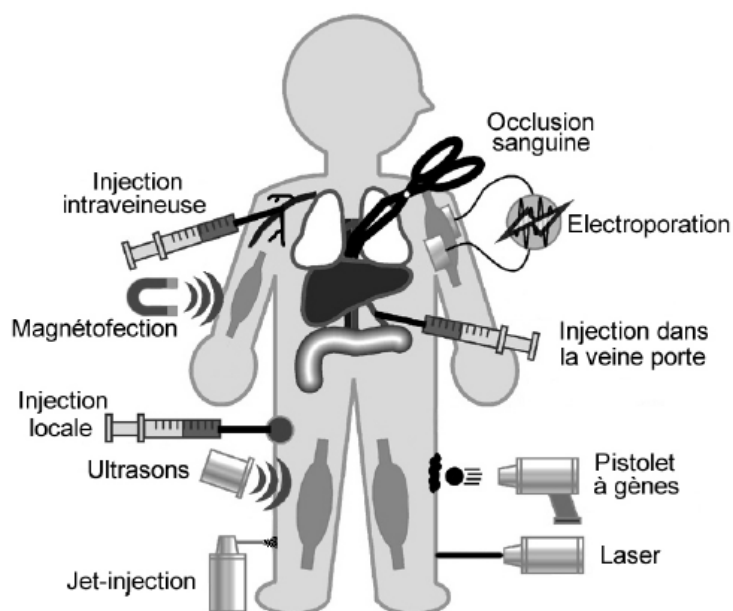


Figure 73. Principales méthodes physiques dans le transfert de gènes (Niidome & Huang, 2002).

a. L'ADN nu

En 1990, Wolff démontre que l'expression d'un gène pouvait être obtenue dans le muscle strié de souris par simple injection d'ADN plasmidique et ce, quel que soit le gène rapporteur (chloramphénicol, acétyltransférase, luciférase et β -galactosidase). Cette expression restait détectable dans les cellules musculaires plus de deux mois (Wolff et al, 1990). En dépit d'une faible efficacité de transfection, le transfert de gènes en thérapie génique du cancer, dont le produit déclenche une toxicité de voisinage appelée *effet bystander* (gènes suicides) ou une réponse immune antitumorale, permet d'obtenir l'effet thérapeutique escompté et significatif (Baque et al, 2002; Pope et al, 1997; Soler et al, 2000).

En 2006, l'utilisation d'ADN nu représentait **17% des essais**. En 2007, 192 essais cliniques de thérapie génique ont été ou sont en cours de réalisation dans le monde, dont deux tiers sur le cancer (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

Pour le **carcinome hépatocellulaire**, le mode d'administration était l'**injection intratumorale** du gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine **p53** (Simoes et al, 2005).

C'est la méthode la plus simple pour administrer du matériel génétique et la plus sûre car l'absence de vecteur réduit les risques de réponse immunitaire. L'injection de l'ADN se fait dans un tissu ou dans un vaisseau sanguin par différents modes d'administration : **injection intraveineuse, injection locale dans un tissu, injection artérielle ou injection dans la veine porte**. L'injection directe concerne plusieurs organes (Nishikawa & Huang, 2001), les muscles squelettiques, le foie (Hickman et al, 1994), la thyroïde, le muscle cardiaque, les organes urologiques, la peau et les tumeurs. Le groupe de Wolff a montré que l'injection d'un **grand volume avec un débit élevé** dans la veine porte du foie ou l'artère des muscles ciblés permet d'atteindre un taux élevé d'expression (Wolff et al, 1990; Zhang et al, 2001). Cependant, l'ADN non protégé, est susceptible d'être dégradé rapidement par les DNases dans le sérum et la clairance par le système phagocytaire mononucléaire. En raison du niveau d'expression faible et de l'aire d'injection limitée, il peut être nécessaire d'injecter de grandes quantités pour obtenir une réponse significative ou d'avoir recours aux techniques détaillées ci-après (Li & Ma, 2001; Niidome & Huang, 2002).

b. Le pistolet à gènes ou biolistique

Cette technique permet d'introduire des particules, d'or ou de tungstène, recouvertes d'ADN, directement dans le cytoplasme des cellules, voire dans le noyau. Si cette méthode est prometteuse pour transfecter in vitro des cellules difficilement accessibles par les techniques classiques, comme les neurones, son principal défaut est de n'avoir qu'une pénétration trop superficielle dans les tissus in vivo. Cependant, des essais ont été menés sur le **foie** (Kuriyama et al, 2000), par exemple pour appréhender la régulation de l'expression du **cytochrome P450 2B1** (CYP2B1) en réponse aux xénobiotiques (Muangmoonchai et al, 2002).

c. L'injection sans aiguille

Elle peut être réalisée sous haute pression, grâce à un système de propulsion à air comprimé, appelé « **jet injection** ». Cette technique endommage peu l'ADN et permet une bonne pénétration dans les tissus, meilleure qu'avec une aiguille ou un pistolet à gènes (Niidome & Huang, 2002).

d. Les ultrasons

Utilisés cliniquement à des fins diagnostiques et thérapeutiques, ils peuvent également améliorer le transfert de gènes après injection locale. L'équipe de Taniyama (Taniyama et al, 2002) a montré que les ultrasons induisaient la formation de pores dans les membranes cellulaires et facilitaient la translocation de l'ADN.

e. Le laser

Le laser est une autre source d'énergie qui permet de faciliter l'entrée du plasmide dans le cytoplasme. En utilisant un laser femtoseconde dans le proche infrarouge, l'équipe de Zeira (Zeira et al, 2003; Zeira et al, 2007) a obtenu une expression prolongée supérieure à 100 jours du gène de l'érythropoïétine, sans dommage dans les tissus ni effet secondaire.

f. L'occlusion du flux sanguin

L'occlusion du flux sanguin, soit de la veine cave soit de l'artère hépatique et de la veine porte, immédiatement après l'injection intraveineuse périphérique d'ADN nu, augmente le niveau d'expression du gène dans le foie de façon significative. Quand le flux est arrêté momentanément, l'ADN pourrait se lier de façon stable aux récepteurs des hépatocytes et être internalisé selon la théorie de Budker (Budker et al, 2000).

g. L'électrotransfert ou électroporation

L'électrotransfert consiste, en l'application de courtes impulsions d'un champ électrique, qui induit une électropéabilisation transitoire des membranes cellulaires à laquelle s'ajoute un effet électrophorétique qui permet la migration d'ADN à l'intérieur des cellules cibles. Il faut toutefois souligner que l'électroporation est une technique de transfection qui s'applique uniquement aux cellules en suspension bien que des technologies soient en cours de développement pour des transfections de cellules adhérentes en culture ou dans des tissus « solides » in vivo. Les principaux paramètres à prendre en considération sont la quantité d'ADN, la durée, le nombre et le voltage des impulsions, la nature de l'électrode et l'orientation du champ électrique par rapport aux cellules (Bloquel et al, 2004). A terme, l'électroporation pourrait avoir des applications immunologiques parce que les cellules sont en suspension et présente les avantages de l'injection en site propre associée à une efficacité élevée. En raison de leur facilité d'accès, la peau et les muscles sont de bons candidats pour l'électroporation, permettant l'injection intra-musculaire d'ADN plasmidique nu dans le cadre de la vaccination d'ADN, comme l'expression de l'antigène de surface de l'hépatite B. Heller a apporté la preuve de l'efficacité de la technique par injection locale suivie de l'application d'un champ électrique sur des foies de rat porteurs d'un **carcinome hépatocellulaire** in vivo (Heller et al, 2000). Parallèlement à la méthode d'injection locale du plasmide au foie, l'équipe de Liu et Huang a développé une méthode de transfert de gènes par électroporation suite à l'injection systémique d'ADN nu dans la veine de la queue. Elle présente l'avantage de transférer un plus grand nombre d'hépatocytes (Liu & Huang, 2002a).

Plusieurs générations de matériels d'électroporation ont été mises au point, le Nucléofecteur® (figure 74) et le Microporator® (figure 75) sont les plus récentes. L'originalité du Microporator®, présenté dans l'Annexe 5, est de créer des pores au niveau de la membrane plasmique mais également de l'enveloppe nucléaire. Les deux techniques seront détaillées dans le chapitre Résultats 1.



Figure 74. Nucléofecteur® (Amaza)

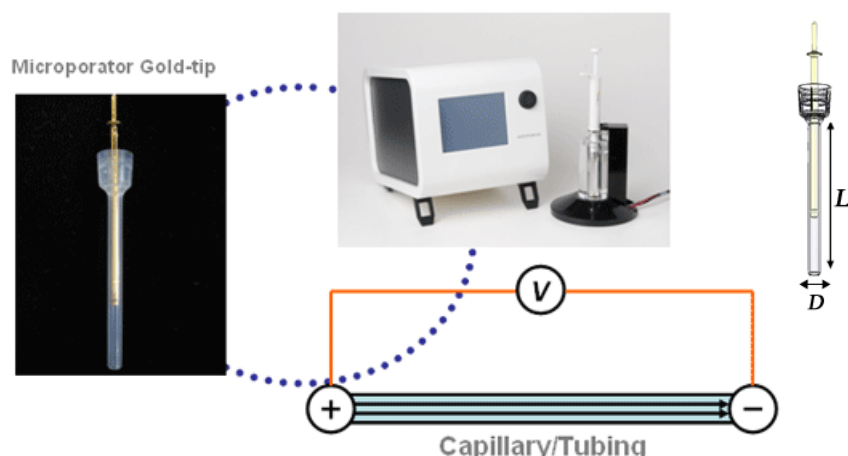


Figure 75. Microporator® (Neon Transfection System - Invitrogen)

h. La magnétofection

L'utilisation d'un fort champ magnétique sur des vecteurs associés à des **nanoparticules superparamagnétiques** (à base d'oxyde de fer) permet l'accumulation rapide des vecteurs sur les membranes des cellules cibles et par conséquent un pic de transfection plus haut et plus précoce. Les principes *in vitro* (Dobson, 2006) et *in vivo* (Dobson, 2006; Pankhurst, 2003) sont décrits figures 76 et 77.

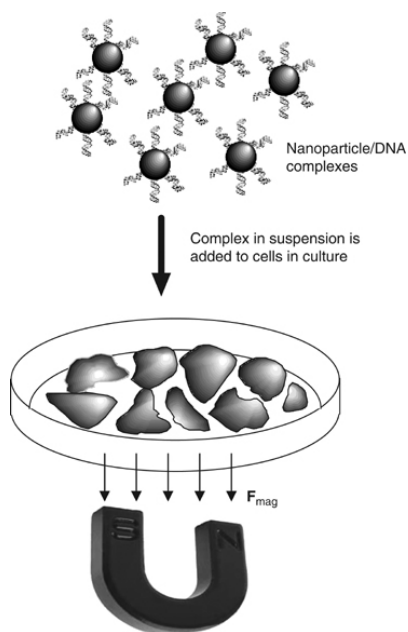


Figure 76. Représentation schématique du transfert de gènes médié par des nanoparticules magnétiques *in vitro*. Le vecteur est attaché aux nanoparticules magnétiques, qui sont ajoutées à la culture cellulaire. Un fort gradient magnétique est placé sous la culture et le gradient attire les particules vers la source magnétique, augmentant le taux de sédimentation de complexes particule/gène. F_{mag} est la force exercée sur les particules par le champ magnétique (Dobson, 2006).

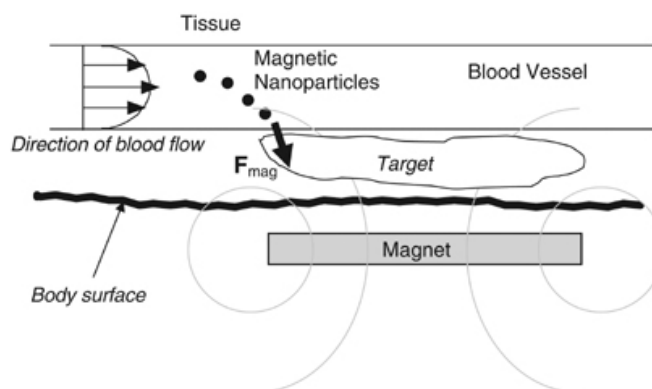


Figure 77. Représentation schématique du transfert de gènes médié par des nanoparticules magnétiques *in vivo*. Les cercles gris indiquent les lignes du flux magnétique dues au disque aimanté permanent *ex vivo*. F_{mag} est la force magnétique exercée sur les particules lorsqu'elles s'écoulent dans la circulation sanguine (Pankhurst, 2003)

La nouvelle génération de magnétofecteur, le Magnefect-nano™ (nanoTherics), souhaite développer des approches thérapeutiques, en effet elle s'est distinguée par des travaux sur le transfert de gènes dans la mucoviscidose en ayant pu franchir les barrières du mucus mais propose également des solutions innovantes pour le ciblage tumoral par des particules magnétiques (figure 78).

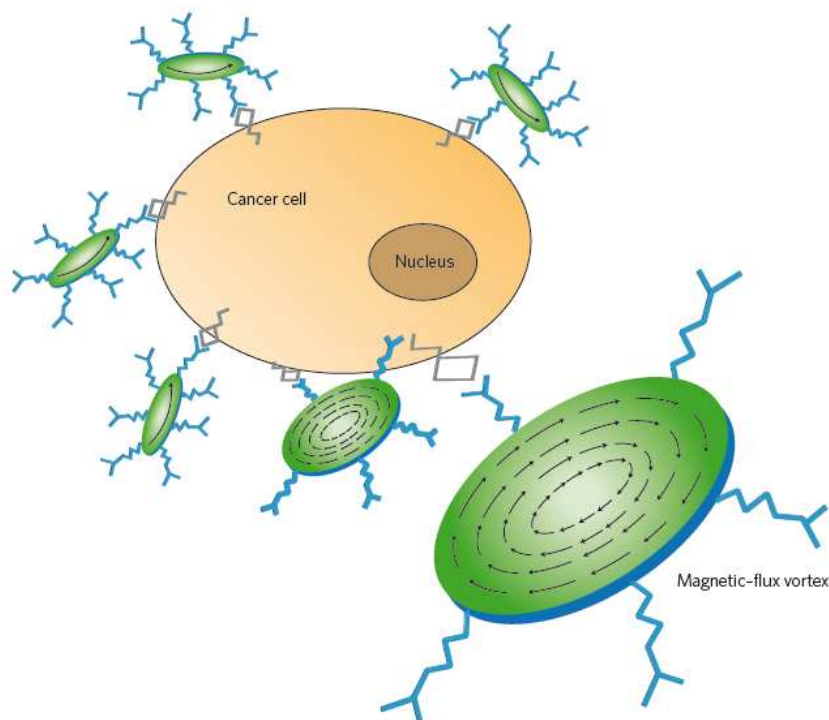


Figure 78. Ciblage tumoral par des particules magnétiques.

Les « spin-vortex discs » magnétiques (en vert) sont décorés d'anticorps (en bleu) qui lient les récepteurs des membranes exprimés par les cellules cancéreuses. L'application d'un champ magnétique alternatif fait tourner les spin-vortex discs, rompant la membrane cellulaire et initialisant l'apoptose par les cascades de signalisation cellulaire (Dobson, 2006; Dobson, 2010).

i. L'injection hydrodynamique ou à haute pression

L'injection rapide d'un grand volume de solution d'ADN nu (de l'ordre de 5 µg injectés en 5 à 8 secondes dans un volume de 1,6 ml de solution saline pour une souris de 20 grammes) dans la veine de la queue peut transfecter efficacement les organes internes, et plus particulièrement le **foie**. Il est suggéré que la solution d'ADN s'accumule principalement dans le foie en raison de la flexibilité de sa structure, qui peut supporter un grand volume, mais aussi en raison de la pression hydrostatique qui force l'ADN à entrer dans les cellules du foie avant que la solution d'ADN ne soit mélangée au sang. De plus, la rupture de la barrière endothéliale, à cause de la pression et facilitée par la fenestration naturelle de cet endothélium, a été proposée comme étant le mécanisme responsable de la forte expression dans le foie. A l'échelle des hépatocytes, Budker a fait l'hypothèse d'un processus d'endocytose de l'ADN plasmidique nu médié par les récepteurs hépatocytaires in vivo (Budker et al, 2000).

j. Le massage

La technique de transfert de gènes non invasive dans le foie d'une souris par massage mécanique a été décrite en 2002 par Liu et Hang (Liu & Huang, 2002b). Cette méthode consiste à masser l'abdomen de la souris après l'injection d'un petit volume d'ADN dans la veine de la queue, ce qui augmente l'expression du gène dans le **foie** (figure 79).

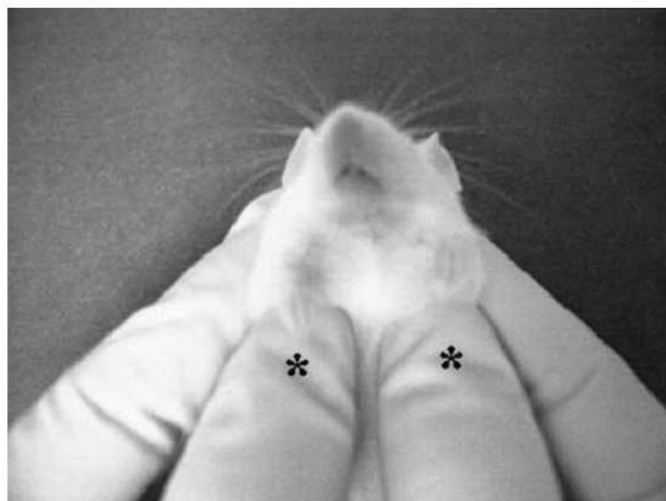


Figure 79. Transfert de gènes non invasif dans le foie d'une souris par massage mécanique. Le procédé consiste à injecter 80 μ g d'ADN nu dilué dans 200 μ l de sérum physiologique NaCl 0,9% dans la veine de la queue puis à placer les deux pouces (étoiles) immédiatement après sur l'abdomen et à pousser le foie vers le fond de l'animal 4 fois 1 seconde (Liu & Huang, 2002b; Pankhurst, 2003)

4. Vecteurs synthétiques

a. Généralités sur les vecteurs synthétiques

Dans l'organisme, l'ADN plasmidique peut être dégradé par les nucléases endogènes, c'est pourquoi l'utilisation de l'ADN nu est limitée. L'ADN est une macromolécule polyanionique qui ne peut donc pas franchir facilement les membranes lipidiques car les têtes polaires des lipides sont neutres ou chargées négativement. Les charges négatives portées par l'ADN doivent être neutralisées pour qu'il puisse franchir la barrière lipidique. Des vecteurs synthétiques ont été développés et connaissent un réel essor.

Le franchissement des membranes cellulaires par les constructions d'acides nucléiques est facilité par les vecteurs synthétiques qui ont notamment la propriété de compacter l'objet constitué par les acides nucléiques et le vecteur, appelé **lipoplexe** ou **polyplexe** ou encore **lipopolyplexe**. Cette notion de compaction est illustrée par la photo et le schéma ci-dessous (figures 80 et 81). Les deux types principaux de vecteurs synthétiques sont en effet de nature lipidique, les lipides cationiques et de nature polymérique, les polymères cationiques.

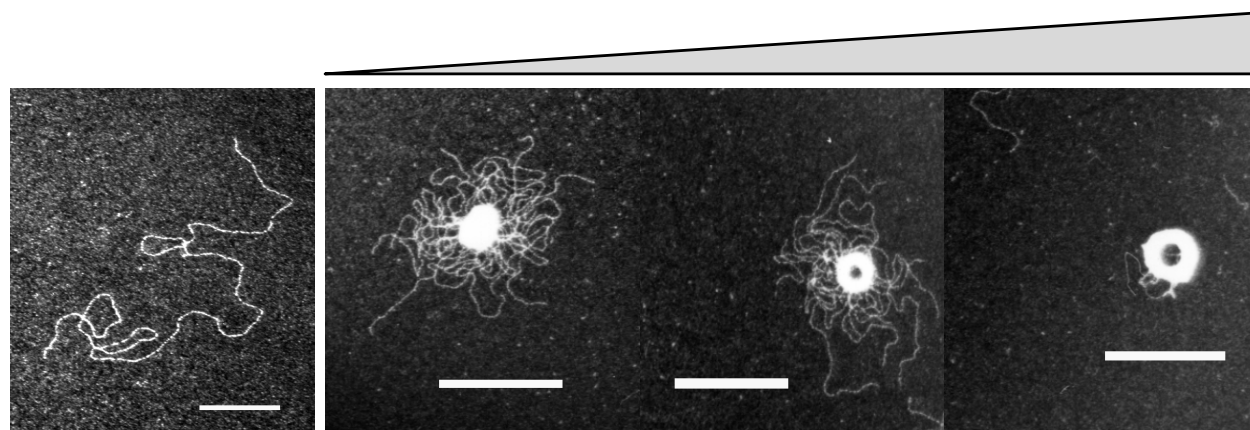


Figure 80. Photographies d'acides nucléiques seules ou compactées dans des vecteurs. Le gradient représente la concentration en vecteur cationique.

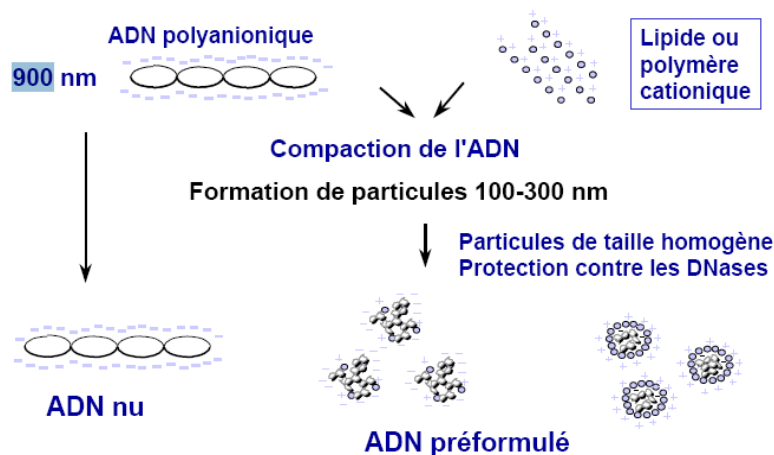


Figure 81. Formation d'un lipoplexe ou d'un polyplexe.

Les vecteurs synthétiques ou chimiques ont été conçus pour améliorer le niveau d'expression du transgène et pour que le produit du gène soit fonctionnel *in vivo*. Les vecteurs appartiennent à plusieurs catégories selon leurs propriétés :

- Former des complexes compactés avec l'ADN de façon à protéger l'ADN des nucléases et des autres composants du sang
- Neutraliser la charge de l'ADN plasmidique
- Cibler spécifiquement des types cellulaires
- Augmenter la transfection d'ADN dans le cytosol ou le noyau
- Se dissocier de l'ADN dans le cytosol
- Relarguer l'ADN dans le tissu pour obtenir une expression continue ou contrôlée

Même si certains furent couronnés de succès, les essais cliniques utilisant des vecteurs viraux ont causé plusieurs décès, c'est pourquoi un effort majeur est désormais porté sur le développement de vecteurs synthétiques moins immunogènes et toxiques. Ils nourrissent un intérêt grandissant qui nécessite d'optimiser les vecteurs pour plus de fiabilité, d'efficacité et moins de cytotoxicité.

Leurs avantages

- Faible immunogénicité, pas de risque infectieux
- Structure et caractérisation physico-chimique du vecteur et des complexes à transfecter associant les agents synthétiques et la molécule d'intérêt (ADN, oligonucléotides, siRNA, peptides, molécules bioactives)
- Taille du transgène non limitée
- Transfection de nombreux types cellulaires *in vitro*
- Facilité de production : simples et rapides à élaborer et à utiliser
- Coût relativement faible
- Etablissement possible *in vitro* d'un clone stable par sélection

La recherche d'une efficacité maximale est bien sûr l'objectif ultime. L'efficacité de transfection de 100% n'est cependant pas toujours requise selon l'objectif. En effet, à 50% du taux d'expression du transgène, l'effet biologique obtenu peut suffire pour mener à bien des expériences, notamment en recherche fondamentale.

Leurs limites

- Efficacité trop limitée *in vivo*, ce qui constitue un problème majeur
- Expression transitoire

La délivrance de gènes basée sur les liposomes appelée **lipofection** a été démontrée pour la première fois par Felgner en 1987 (Felgner et al, 1987). Il a produit le premier lipide cationique appelé **DOTMA** et avait cherché à optimiser la transfection (figure 82) en faisant varier la quantité d'ADN (A), de lipide (B) et le temps d'incubation (C).

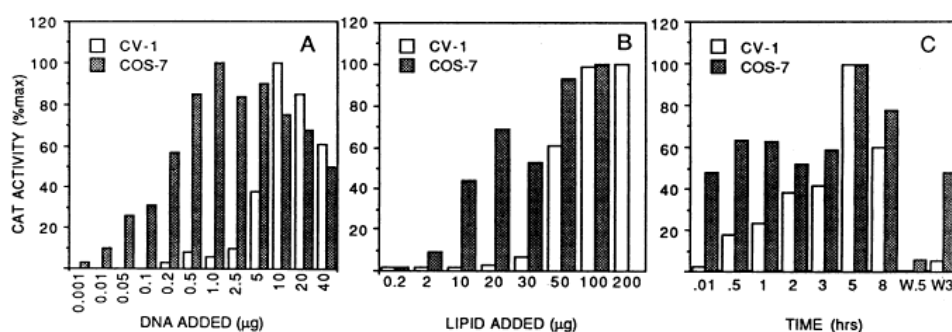


Figure 82. Transfection des cellules CV-1 et COS-7 par le plasmide pSV2cat complexé au lipide PtdEtn/DOTMA (1:1). Les cellules étaient collectées après 2 jours et l'activité CAT (par μg de protéine cellulaire) était déterminée. (A) Les différentes concentrations d'ADN étaient utilisées avec 100 μg de lipide dans les transfections parallèles. (B) Les différentes concentrations de lipide étaient utilisées avec 10 μg ou 1 μg d'ADN respectivement pour les cellules CV-1 et COS-7. (C) Les cellules étaient transfectées en utilisant 100 μg de lipide et soit 10 μg (CV-1) soit 1 μg (COS-7) d'ADN. Après le temps indiqué, 10 ml du milieu de croissance était ajouté. W5 et W3 représentent les incubations parallèles où aux temps indiqués (0.5 et 3 heures, respectivement), le complexe lipide-ADN était enlevé et remplacé par 10 ml de milieu frais (Felgner et al, 1987).

Depuis, nombre de vecteurs synthétiques ont été développés et commercialisés à des fins de transfection *in vitro* et *in vivo*, principalement à base de liposomes et/ou de polymères (figure 83).

Molécule commerciale	Composition
PromoFectin-Hepatocyte (Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany)	Polymère cationique soluble dans l'eau conjugué à un ligand spécifique de l'hépatocyte
TransFectin™ (Bio-Rad, Hercules, USA)	Lipides et colipides : 1,2 dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
Exgen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France)	PEI linéaire (22kDa)
Jet-PEI™ (Polyplus transfection SA, Ozyme, St. Quentin Yvelines, France)	PEI branchée
Jet-PEI™-Hepatocyte (Polyplus transfection SA, Ozyme, St. Quentin Yvelines, France)	PEI linéaire avec résidus galactose ciblant les hépatocytes (récepteurs de type asialoglycoprotéine, ASGP-R ou Gal/GalNAc-R)
FuGENE® 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)	Mélange de lipides et d'autres composants
TransIT-TKO® (Mirus, Madison, USA)	Polymères et lipides
Lipofectin® (Invitrogen, Carlsbad, USA)	DOTMA/DOPE 1:1 (w/w)
Lipofectamine™ (Invitrogen, Carlsbad, USA)	DOSPA/DOPE 3:1 (w/w)
Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Lipide polycationique

Figure 83. Tableau des compositions des molécules commerciales. PEI : polyéthylèneimine, polymère ; DOTMA : N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-n,n,n-triméthylammonium chloride, lipide cationique ; DOPE : dioleoyl phosphatidylethanolamine, lipide neutre ; DOSPA : 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,Ndimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate, lipide polycationique.

Les vecteurs commerciaux les plus fréquemment utilisés dans le transfert de gènes sont composés de liposomes et/ou de polymères. Si leur efficacité est prouvée *in vitro*, les molécules commerciales ne répondent pas à toutes les attentes car elles présentent des limites d'utilisation *in vivo* et *in vitro* qui ne sont pas adaptées à tous les types cellulaires avec notamment des cytotoxicités très variables. C'est la raison pour laquelle, les chimistes élaborent de nouvelles molécules adaptées à des types cellulaires précis.

Le développement des nanotechnologies permet aujourd'hui de proposer également l'idée de «vectorisation» des médicaments qui a fait l'objet du dossier « Sagascience – Nanotechnologie et Santé » du site du CNRS :

<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/vecto/vecto.htm>.

La recherche a conçu des systèmes submicroniques d'administration des médicaments en s'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques et de nouveaux matériaux, capables de protéger la molécule active de la dégradation et d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace. Les trois catégories de vecteurs les plus représentées sont les liposomes et les polymères qui composent les nanocapsules et les nanosphères.

b. Vectorisation par liposomes

Le **liposome** est une vésicule biodégradable composée :

- d'une **double couche de phospholipides**
- d'un **compartiment aqueux**

Certains liposomes peuvent comporter plusieurs bicouches de phospholipides et plusieurs compartiments aqueux. Le principe actif du médicament est encapsulé dans la **phase aqueuse** quand il est **hydrophile**, et dans la **bicouche** quand il est **lipophile** (figure 84). La **structure phospholipidique** du liposome est proche de celle de la membrane de la plasmidique : le liposome est dit « biomimétique ». Un liposome est environ 70 fois plus petit qu'un globule rouge. Sa taille varie **entre 100 et 300 nm**.

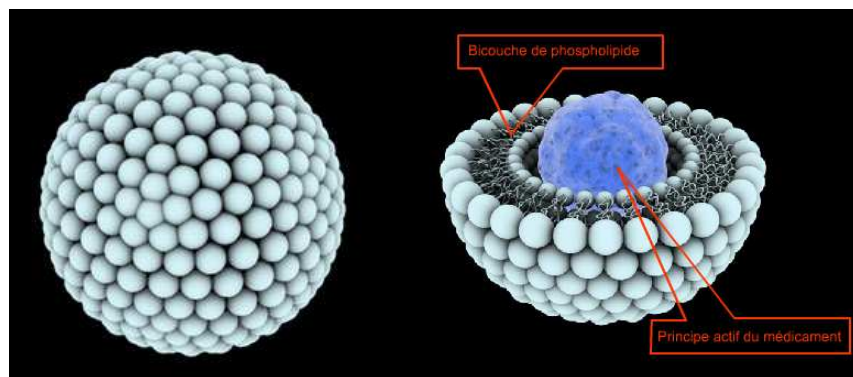


Figure 84. Représentation d'un liposome.

A gauche : Un liposome, constitué d'une bicouche de phospholipides entourant un compartiment aqueux. Un liposome peut comporter plusieurs bicouches. A droite : Un liposome vu en coupe. On voit la bicouche de phospholipides et au centre le médicament hydrophile contenu dans le compartiment aqueux central.

© sagascience/F. Caillaud. D'après <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/vecto/vecto.htm>.

- Les lipides cationiques

Les lipides cationiques, constituant les liposomes, sont différents des phospholipides mais ils partagent une structure commune (figure 85). Ils sont composés de trois parties, à savoir une **tête polaire cationique hydrophile**, un **bras espaceur**, un **groupement de liaison (linker)** et une **partie hydrophobe**. L'ancre hydrophobe est en général composée de deux chaînes d'acides gras ou d'un cholestérol. C'est la **tête cationique** qui **interagit avec l'ADN**, car elle est souvent composée par des fonctions amines protonnées. Ces fonctions vont interagir avec les phosphates de l'ADN entraînant la formation d'un

complexe ADN/lipide cationique appelé lipoplexe. Le bras espaceur permet de relier les deux pôles. La partie hydrophobe est constituée soit de deux chaînes d'acides gras de 12 à 18 atomes de carbone en longueur (Cn) soit d'un cholestérol (Vivien, 1999). Les acides gras les plus utilisés sont l'acide oléique (C18), l'acide palmitoléique (C16) ou l'acide myristylique (C14).

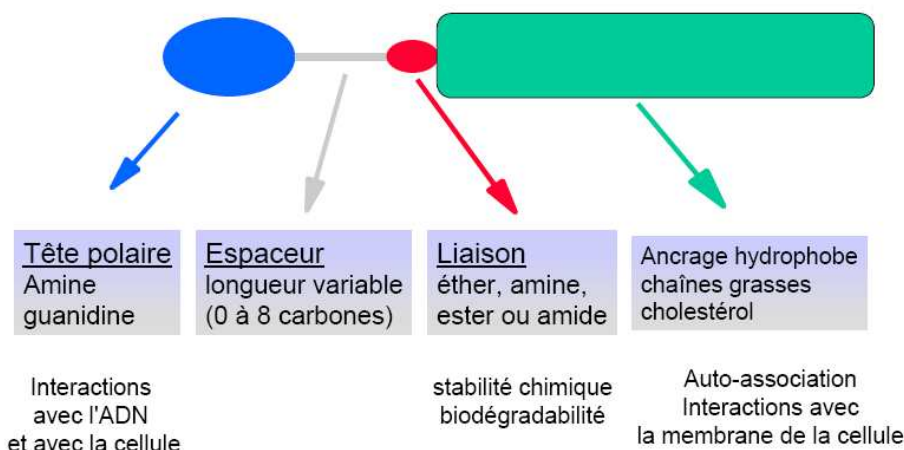


Figure 85. Représentation schématique d'un lipide cationique

Les lipides cationiques sont divisés en trois grandes familles : les lipides monocationiques qui présentent une seule fonction amine, les lipides polycationiques qui présentent plusieurs amines au niveau de leur tête polaire, et les dérivés du cholestérol.

Les lipides cationiques sont souvent sous la forme de liposome (petite vésicule lipidique) en association avec un colipide neutre comme la DOPE (dioléoylphosphatidyl-éthanolamine) (Vivien, 1999).

Les liposomes sont les plus utilisés des vecteurs dans le transfert de gènes *in vivo*, la littérature est très abondante sur ces composés très efficaces et entraînant peu de toxicité (Bertin et al, 2007; Morille et al, 2008; Niidome & Huang, 2002).

▪ Les lipides monocationiques

Les liposomes sont composés de lipides cationiques classés selon la charge (monocationique ou polycationique) et la nature de la chaîne (aliphatique) ainsi, trois groupes de lipides cationiques existent :

Les **lipides aliphatiques monovalents** caractérisés par une simple fonction amine au niveau de la tête polaire : **DOTMA** (N[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride), **DOTAP** (1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane) **DMRIE** (N-(2-hydroxyethyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(tétradécyloxy-1-propanaminiumbromide) et **DOTIM** (1-[2-(oleoyloxy)ethyl]-2-oleyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolinium chloride).

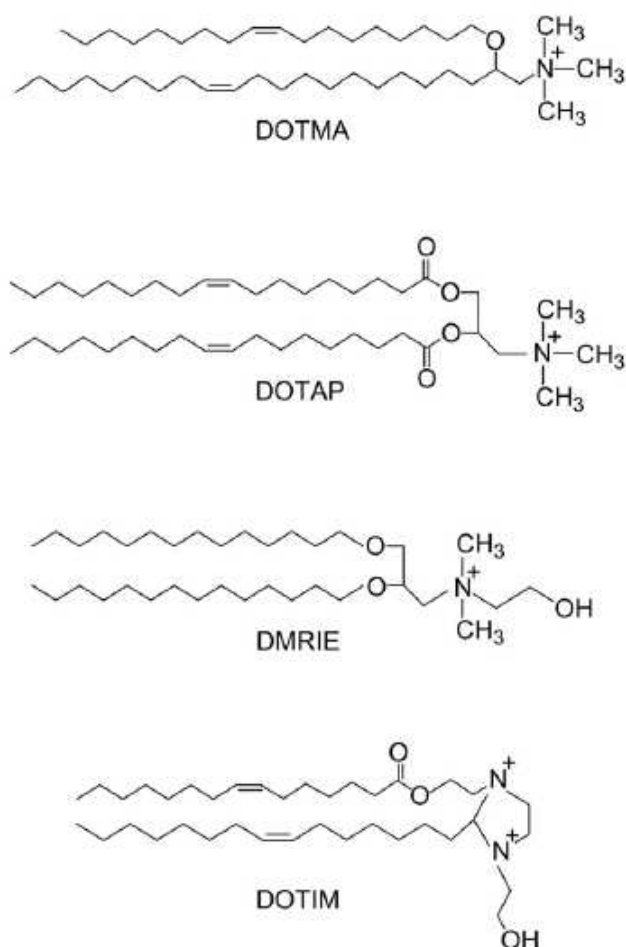


Figure 86. Structures chimiques des DOTMA, DOTAP, DMRIE et DOTIM

▪ Les lipides multivalents

Les **lipides aliphatiques multivalents** dont la tête polaire contient plusieurs fonctions amines telles que le groupe spermine appelé **DOGS** (dioctadecylamidoglycylspermine).

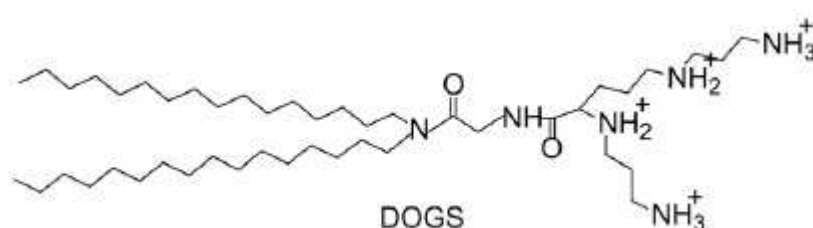


Figure 87. Structure chimique du DOGS

▪ Les dérivés cationiques du cholestérol

Les **dérivés cationiques du cholestérol** comme le **DC-Chol** [N-(N0,N0-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol et le **BGTC** (bis-guanidium-tren-cholestérol, DOPE: 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphoéthanolamine) :

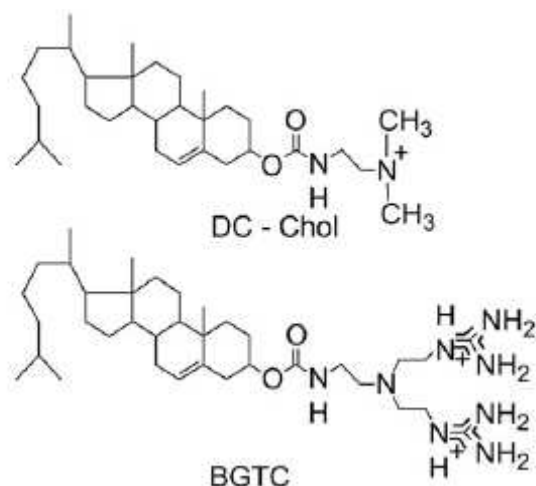


Figure 88. Structures chimiques des DC-Chol et BGTC

La ou les charge(s) positive(s) leur confère(nt) deux avantages majeurs :

- la possibilité de s'associer à l'ADN pour former un complexe appelé «lipoplexe»
 - la possibilité d'interagir avec les membranes cellulaires anioniques, ce qui optimise leur pénétration à l'intérieur de la cellule.
- Les colipides ou lipides helpers

Les colipides ou lipides helpers ont la propriété d'être fusogéniques. Il en existe plusieurs qui sont fréquemment utilisés en association avec les lipides cationiques à des pourcentages variables dans la formulation des liposomes, on trouve notamment :

La **DOPE** améliore l'efficacité de transfection (Farhood et al, 1995) par exemple sur les hépatocytes souris (Gilot et al, 2002b).

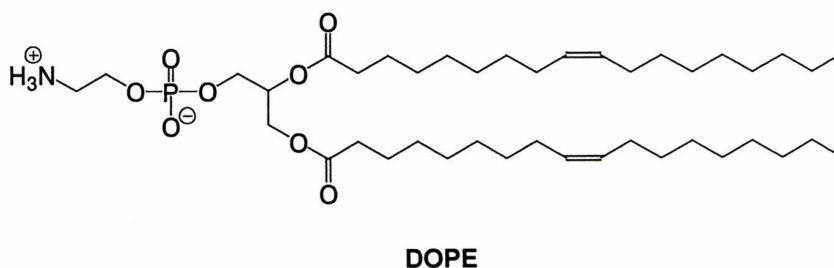


Figure 89. Structure chimique de la DOPE

Le **cholestérol** augmente la fusion.

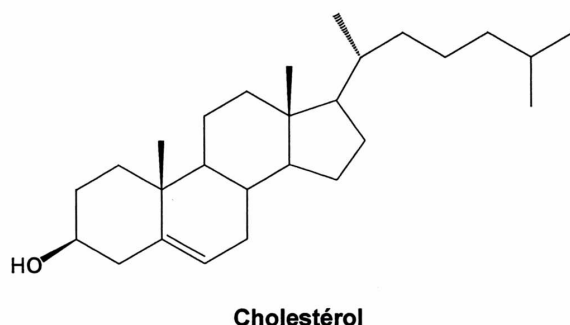


Figure 90. Structure chimique du cholestérol

Le **GR** (développé par Gildas Réthoré, ENSC Rennes) est un diol héli-macrocyclique dont l'efficacité a été prouvée sur les cellules épithéliales pulmonaires.

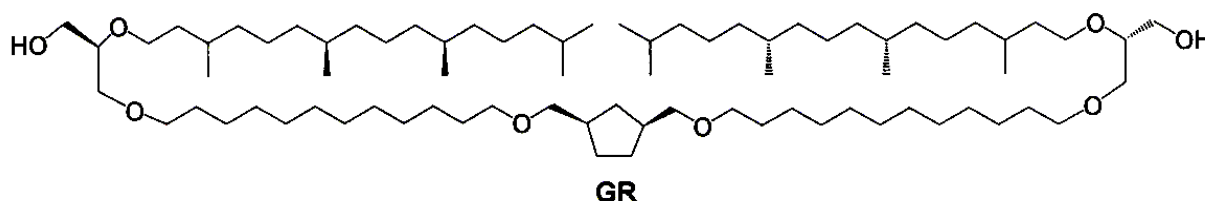


Figure 91. Structure chimique du GR

■ Structure des liposomes

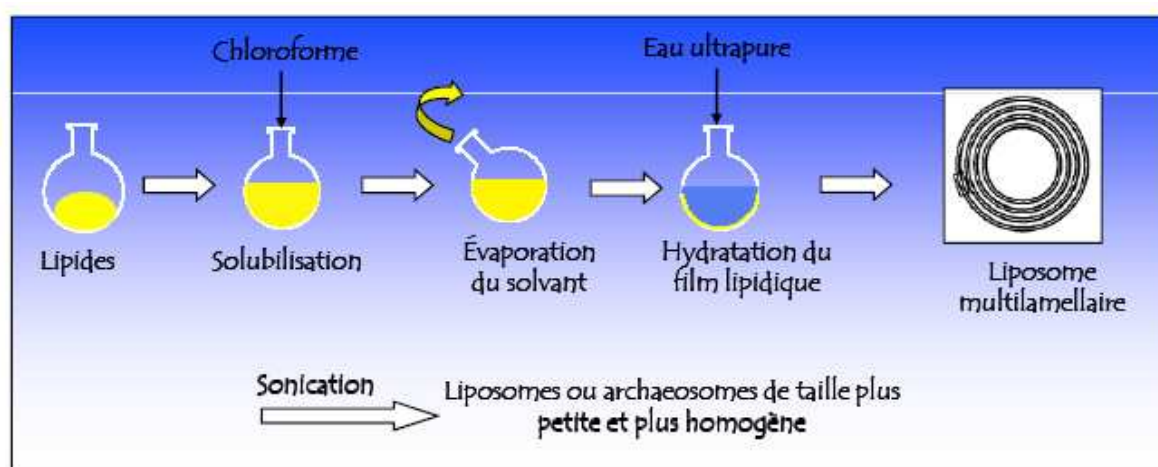


Figure 92. Préparation des liposomes et archaeosomes. D'après Barbeau, Archaeosomes : nouveaux outils pour la vectorisation de principes actifs et de gènes thérapeutiques. Colloque recherche de la fédération Gay-Lussac. La chimie du & pour le vivant, ENSC Rennes, 4 et 5 décembre 2008.

Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux (figures 92 et 93). Leur taille est comprise entre 20 nm et plusieurs μm (figure 94), mais le plus souvent entre 100 et 300 nm. En milieu aqueux, l'organisation la plus stable est celle qui permet de réduire les interactions entre composants hydrophobes et molécules d'eau.

Ainsi, les lipides s'organisent en général en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (extérieur ou intérieur). Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule, qui isole un compartiment interne aqueux. L'épaisseur d'une bicouche est environ égale à deux fois la longueur des plus grands lipides qui la composent (figure 95).

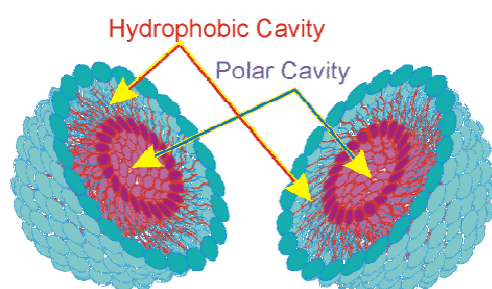


Figure 93. Cavités hydrophobe et hydrophile.

Les liposomes peuvent encapsuler et transporter des molécules hydrosolubles dans leur cavité polaire et liposolubles dans leur cavité hydrophobe.

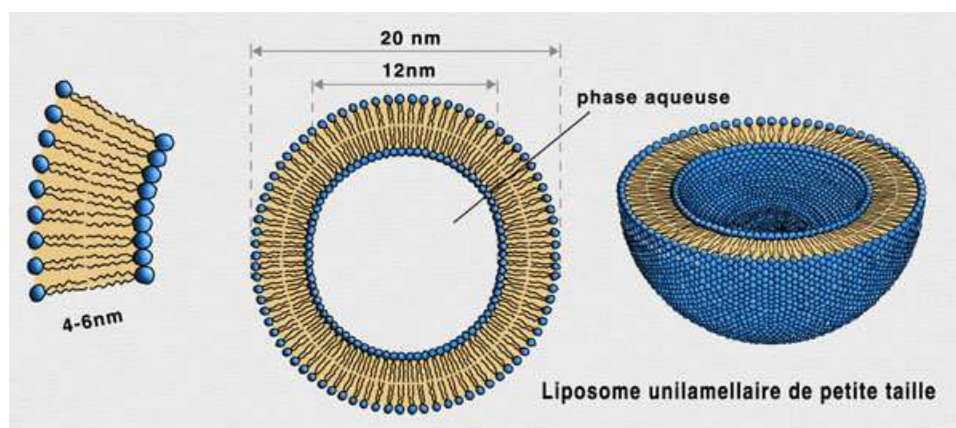


Figure 94. Dimensions d'un liposome unilamellaire



Figure 95. Liposomes visualisés par microscopie optique (à gauche) et électronique à transmission (à droite). Les « Croix de Malte » à gauche sont caractéristiques de la formation de liposomes. A droite, les liposomes sont représentés par des sphères concaves et convexes. <http://www.ensc-rennes.fr/genopole/>, 2009.

■ Structure des lipoplexes

La complexation des acides nucléiques se fait par interactions électrostatiques conduisant à la formation de structures très différentes caractérisées par diffraction aux rayons X.

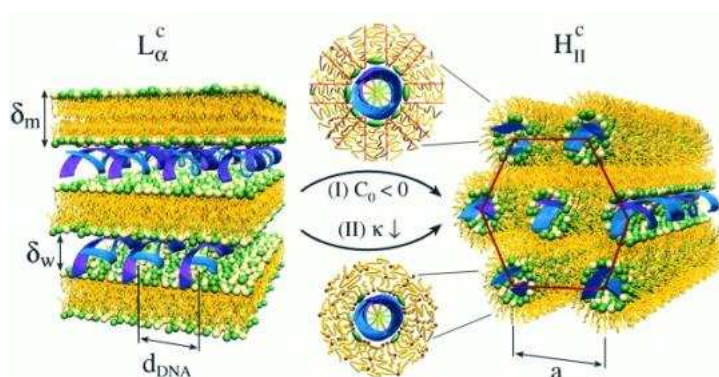


Figure 96. Ultrastructure des complexes cationiques liposomes/ADN (lipoplexes). Les hélices d'ADN sont montrées en bleu. La formation du lipoplexe en couches (gauche) ou hexagonal (droite) dépend des lipides cationiques utilisés (Koltover et al, 1998).

Deux grands types de structures existent (figure 96):

- Organisation lamellaire ou en couches avec des chaînes d'hydrocarbures fluides
- Organisation hexagonale

Le choix de l'une des deux architectures est défini par la nature des lipides cationiques utilisés, les rapports de charge et la formulation.

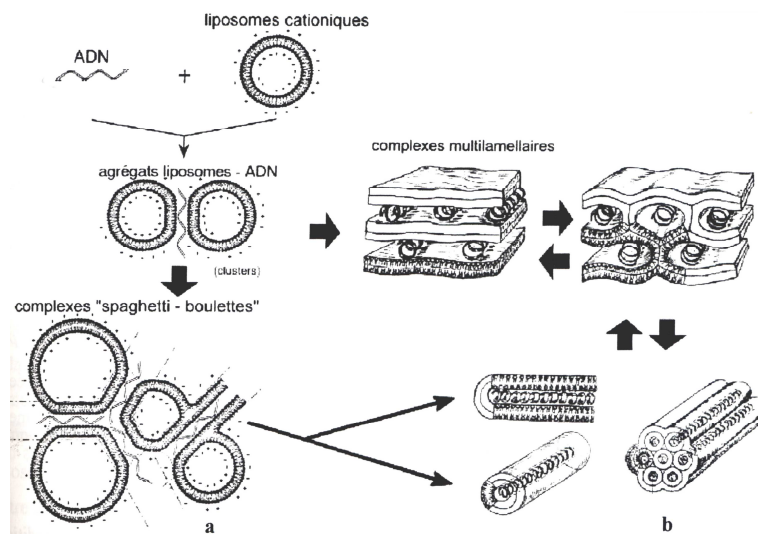


Figure 97. Structure des agrégats supramoléculaires ADN/lipide cationique.

La structure des lipoplexes est encore mal connue, mais quelques modèles ont cependant été publiés. Selon leur formulation, ces structures forment des arrangements dits « spaghetti-boulettes » (a) ou des arrangements multilamellaires, dits « lasagnes » (b), selon leur formulation. D'après Thèse Miramon, 2001.

Les agrégats peuvent changer d'organisation (Koltover et al, 1998) si bien que trois représentations de structures sont possibles (Bertin et al, 2007) (figure 97) :

- Couches superposées de lipides
- Micelles renfermant l'ADN
- Structures mixtes cellulaires

Toutefois, les corrélations entre le type d'architecture et l'efficacité de transfection ne sont à ce jour pas clairement élucidées.

- Mécanisme de la lipofection

Un auto-assemblage des vecteurs et de l'ADN se produit pour former des complexes supramoléculaires (figure 98).

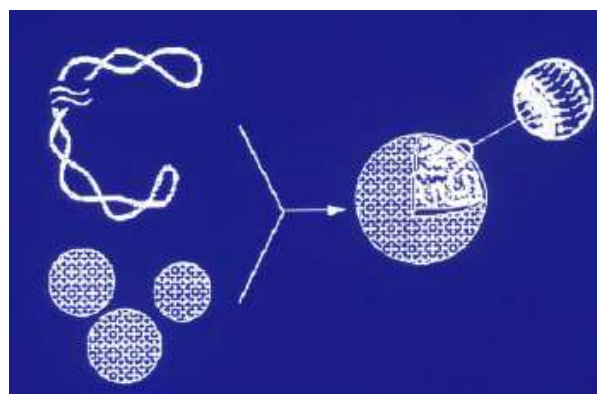


Figure 98. Interactions électrostatiques ADN/Vecteur (liposomes ou polysomes)

D'après Lehn, 3^{ème} Carrefour OUEST-Genopole®, Brest, 2006

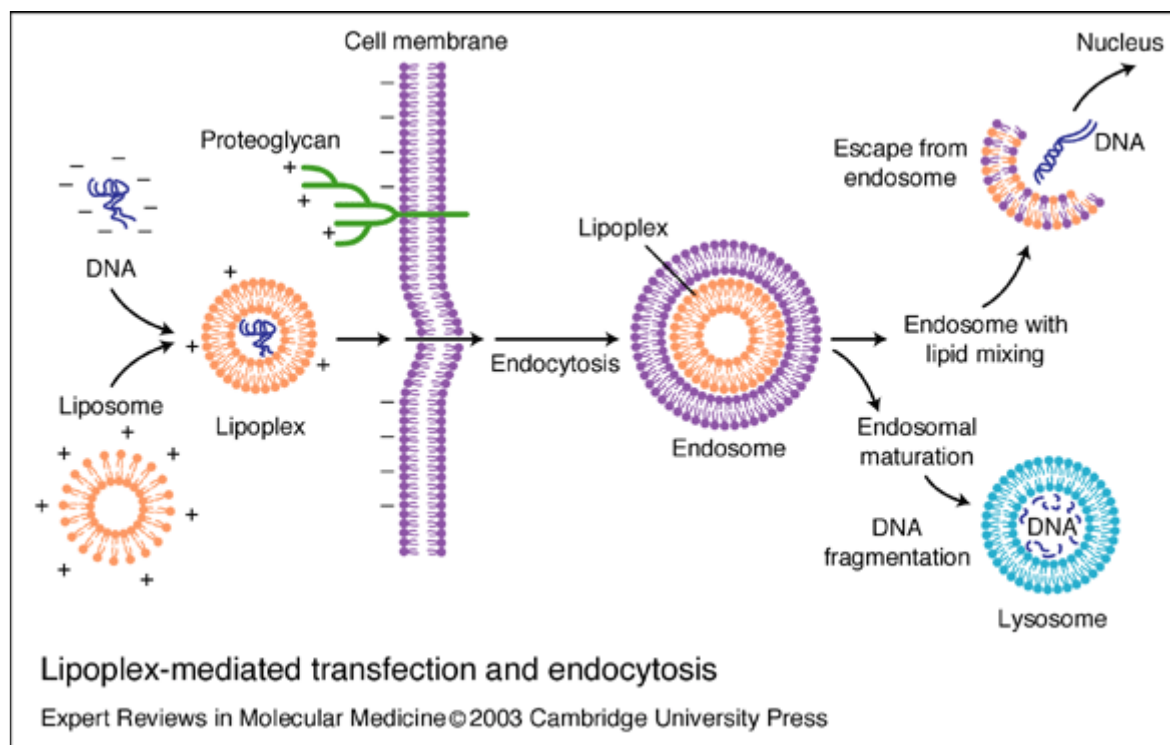


Figure 99. Transfection médiée par les lipoplexes et endocytose.

Le mécanisme de la vectorisation d'acides nucléiques médiée par les lipoplexes suit plusieurs étapes :

- L'ADN est complexé au liposome pour former un **lipoplexe**. Il s'exerce une compaction et une protection du lipoplexe, dont la taille est comprise entre 50 et 200 nm. La **stabilité** du complexe est requise à ce niveau.
- Le lipoplexe pénètre en général par endocytose ou fusion lipidique dans la cellule. D'autres voies d'internalisation sont connues telles la pinocytose mais aussi la phagocytose comme en sont capables les hépatocytes (Gilot et al, 2002b). Des formes analogues à des gros oignons sont visibles. Les mécanismes sont le plus souvent clathrine-dépendants. Il faut souligner que le liposome affecte le fonctionnement des protéines membranaires.
- A la suite de l'endocytose, une double membrane s'organise autour du lipoplexe formant ainsi un **endosome** (figure 99). L'ADN est protégé par les liposomes cationiques.
- Après formation d'un endosome, le pH dans les endosomes s'acidifie à pH5 ce qui évite la dégradation par les lysosomes et permet la sortie de l'endosome et le relargage dans le cytoplasme. Seule une faible proportion de ces complexes arrive à échapper à la dégradation par les lysosomes. La théorie de la sortie de l'endosome serait que les interactions entre les membranes du lipoplexe et de l'endosome entraîneraient un « flip-flop » dû à une acidification du pH endosomal ce qui déstabiliserait le lipoplexe et la membrane endosomale, permettant ainsi la libération de l'ADN dans le cytoplasme (Wagner et al, 1990; Zelphati & Szoka, 1996).
- Le lipoplexe se dissocie en général avant la translocation nucléaire et l'ADN est relargué à proximité du noyau.
- La localisation nucléaire nécessite une **instabilité** du lipoplexe pour la translocation dans le noyau de l'ADN plasmidique.
- Décompaction de l'ADN plasmidique et une prise en charge par la machinerie de transcription

L'entrée dans le noyau reste difficile car celui-ci est limité par une double membrane qui comporte des pores de petite taille. Lors de la mitose, l'enveloppe nucléaire disparaît momentanément, il est alors possible pour l'ADN d'être transloqué dans le noyau (Oudrhiri et al, 1997). L'ADN peut alors être disponible pour la machinerie de transcription et être transcrit. Cependant, son expression reste transitoire car il n'est pas directement inséré dans le génome.

Les premiers travaux de Felgner et de Behr essayaient déjà d'appréhender les étapes du routage (Behr et al, 1989; Felgner et al, 1987).

■ Paramètres influençant le mécanisme

Behr a très tôt étudié le temps de transfection, la quantité d'ADN et le charge-ratio par rapport à l'activité de CAT (figure 100). Ici, les résultats sont exprimés en pourcentage d'une activité maximale, à la différence de Felgner. Il faut souligner que les méthodes de mesure d'expression du gène diffèrent souvent, d'où la difficulté de comparer les études (Behr et al, 1989).

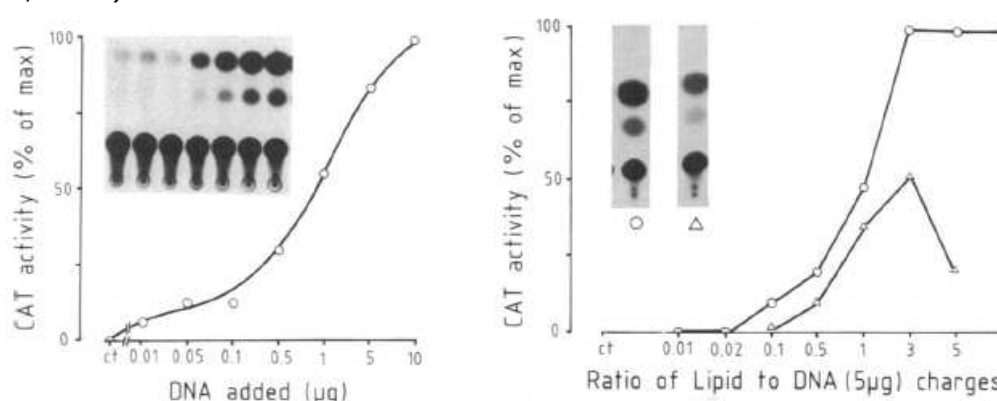


Figure 100. Efficacité de transfection en fonction de la quantité d'ADN et du CR (Behr et al, 1989).

Le charge-ratio reflète les interactions ADN/Vecteur, il est défini par le rapport de charges positives sur le nombre de charges négatives. Autrement dit, le rapport de charges entre les charges du lipide cationique et de l'ADN.

Si un lipide a 1 charge positive et l'ADN 2 charges négatives, le CR sera 0,5.

La stabilité des lipoplexes est dépendante du charge ratio (figure 101) :

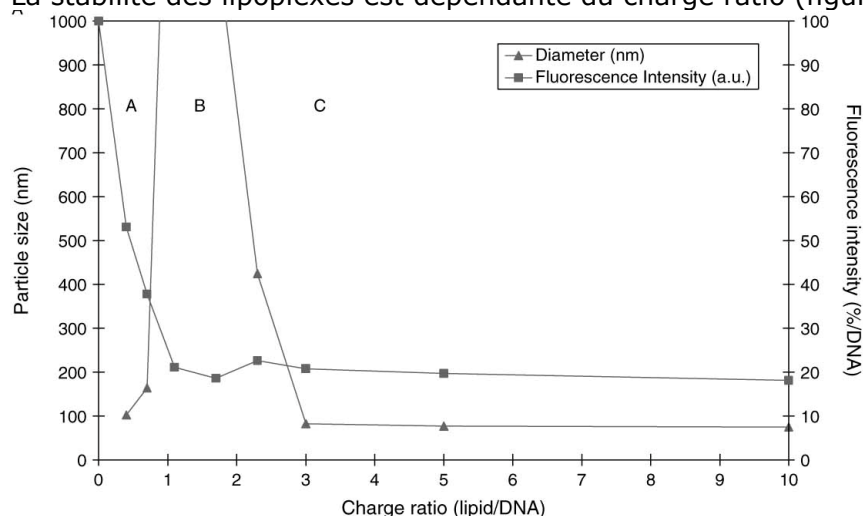


Figure 101. Stabilité des lipoplexes selon le CR. Détermination de la taille (triangles) et test d'intercalation du bromide d'éthidium (carrés) des complexes ADN/lipides cationiques résultant de l'association des liposomes cationiques RPR209120/DOPE et d'ADN supercoiled à différents CR lipides/ADN (Tranchant et al, 2004).

Quand le CR est trop petit (zone A : $CR < 1$) ou trop élevé (zone C : $CR > 3$), il s'exerce une **répulsion** respectivement - - ou + +, tandis qu'une **fusion** est observée lorsque le CR est intermédiaire ($1 < CR < 3$).

En général, la transfection est réalisée avec un charge-ratio élevé (Behr, 1993), cependant un CR élevé génère une forte toxicité. Les études biophysiques et le mécanisme d'internalisation d'Almofiti ont confirmé l'importance du charge-ratio (Almofiti et al, 2003)(figure 102).

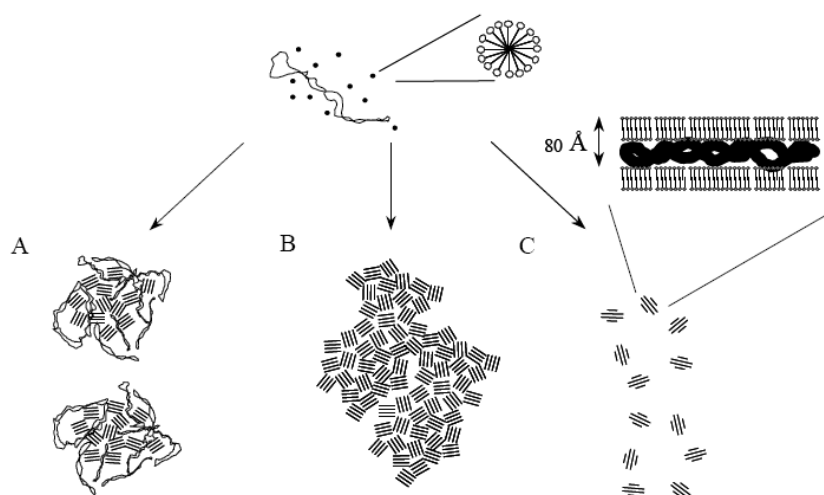


Figure 102. Structure des lipoplexes selon le rapport des charges cationiques du vecteur sur les charges anioniques de l'ADN. A : rapport < 1 . B : rapport au voisinage de 1, la neutralité des complexes induit leur agrégation. C : rapport supérieur à 1, de petites particules globalement cationiques sont formées.

Wangerek a démontré la différence de structuration entre ADN et lipides (figure 103, page suivante). Plus il y a de lipides, plus l'ADN est compacté (Wangerek et al, 2001).

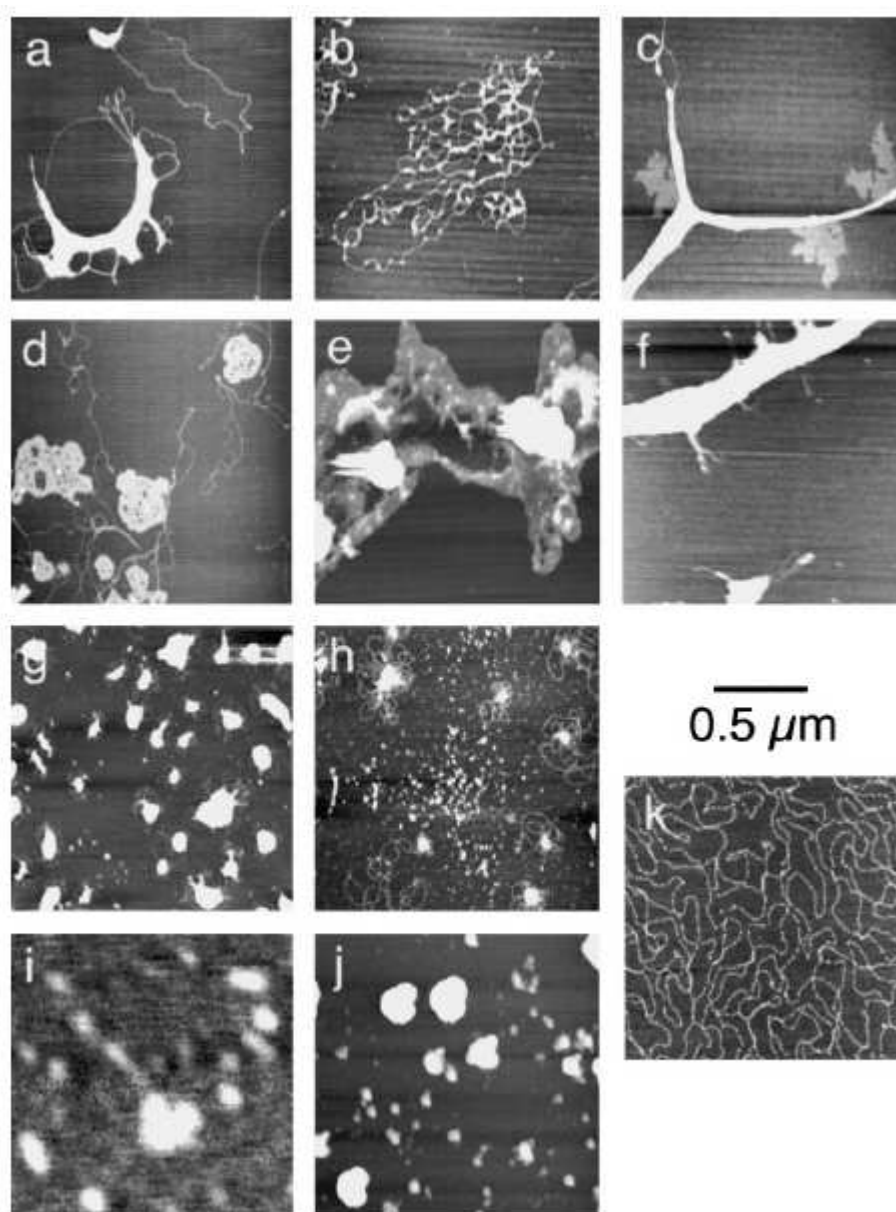


Figure 103. Images de microscopie par force atomique de lipoplexes selon le CR. (a)±(c) DNA-Lipofectin aux ratios 1 : 3, 1 : 6 et 1 : 10, respectivement ; (d)±(f) DNA±DOTAP aux ratios 1 : 3, 1 : 6 et 1 : 10, respectivement ; (g), (h) DNA±Lipofectamine aux ratios of 1 : 3 and 1 : 10, respectivement ; (i), (j) DNA±DOSPER aux ratios 1 : 3 and 1 : 10, respectivement ; (k) DNA seul (Wangerek et al, 2001)

▪ Voies d'entrée des lipoplexes

Les effets sélectifs des traitements pharmacologiques ont été utilisés (figure 104) car ils procurent un outil de diagnostic pour distinguer les voies d'endocytose (Khalil et al, 2006). Les différentes voies d'entrée sont schématisées ci-dessous (figure 105).

Pathway	Pharmacological treatment	Effect	Comment
Clathrin-coated vesicles	Cytosol acidification	'Selective' inhibition [48] Aberrantly assembled clathrin 'microcages' [49] and APs [50] assemble on membrane [50]	Other pleiotropic/non-specific effects possible Mechanism of action unknown
	K ⁺ -depletion	'Selective' inhibition [51] Clathrin, but not adaptors, dissociates [50] Accumulation of microcages [57]	Cell-type differences Mechanism of action unknown
	Hypertonicity	'Selective' inhibition [52,53] Same effect as K ⁺ -depletion	Other pleiotropic/non-specific effects possible Mechanism of action unknown
	Chlorpromazine	'Selective' inhibition [54] APs and clathrin dissociate from plasma membrane	Other pleiotropic effects occur (e.g. receptor recycling is affected) Mechanism of action unknown
Caveolae	Filipin	'Selective' inhibition [15] Sequesters cholesterol	Specificity may be lost at higher concentrations
	Cytochalasin D	Inhibition [25*] Microfilament-disrupting agent	Also inhibits fluid phase uptake from apical surface of polarized epithelial cells Suggests requirement for actin cytoskeleton
	Phorbol esters	'Selective' inhibition [43] Protein kinase C activator	Suggests phosphorylation/dephosphorylation events regulate caveolae internalization
	Okadaic acid	'Selective' stimulation [25*] General phosphatase inhibitor	Suggests phosphorylation/dephosphorylation events regulate caveolae internalization
Non-coated vesicles	No known selective effectors		Appear to be rapidly upregulated in response to inhibition of clathrin-mediated pathway
Macro-pinocytosis	tGF/Phorbol esters	Selective stimulation [5,18]	Transient effect Associated with membrane ruffling (but not inhibited by cytochalasin D)
	Amiloride/Hexamethyl amiloride	Inhibition [5,18]	Also inhibits Na/H ⁺ exchanger and EGF-R tyrosine kinase [55]

Figure 104. Les effets sélectifs des traitements pharmacologiques procurent un outil de diagnostic pour distinguer les voies de pinocytose (Lamaze & Schmid, 1995).

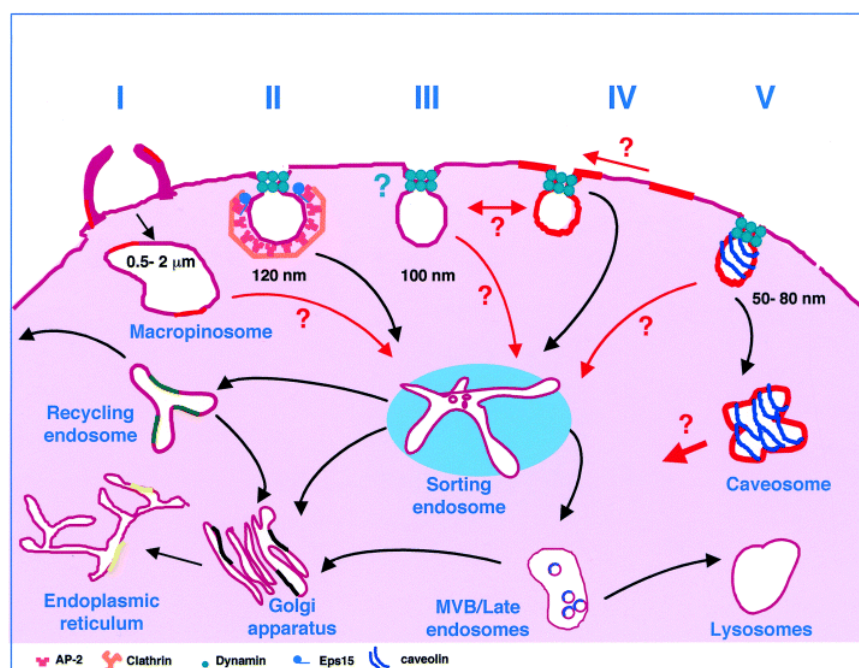


Figure 105. Les multiples voies d'endocytose dans les cellules de mammifères. (I) Macropinocytose (II) Endocytose clathrine-dépendante (III) Non-coated invaginations (IV) Microdomaines incluant les lipides rafts (V) Cavéosome (Johannes & Lamaze, 2002)

▪ Sortie des endosomes

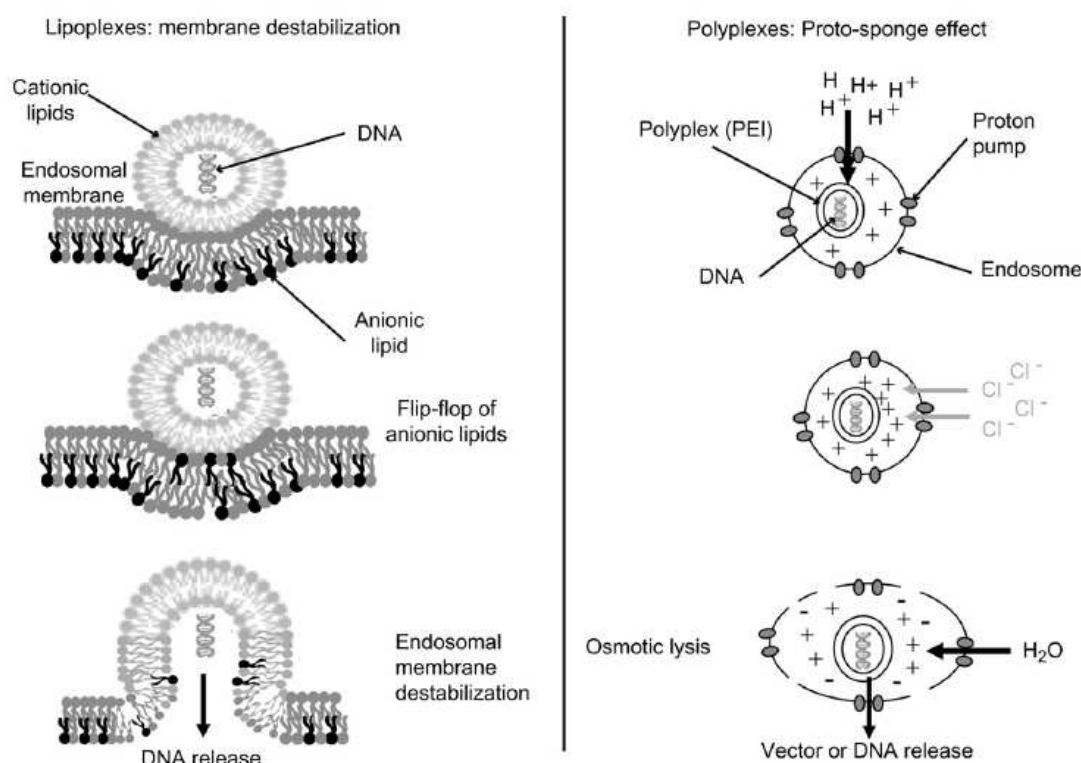


Figure 106. Hypothèse de sortie de l'endosome des lipoplexes et polyplexes (Morille et al, 2008).

Deux mécanismes majeurs initialisent la sortie de l'endosome (figure 106) :

- Les interactions électrostatiques entre les composants anioniques et cationiques des complexes déstabilisent la membrane endosomale, ainsi que la présence de **composants fusogènes** (DOPE).
- Le phénomène « éponge à protons » lié au pouvoir tampon du vecteur polycationique qui provoque une entrée massive d'ions chlorures et d'eau dans l'endosome, son gonflement puis sa rupture.

La revue de Midoux, Pichon, Yaouanc et Jaffrès présente une liste exhaustive des **polymères, peptides et lipides** contenant des résidus **histidine** ou **imidazole** dans les vecteurs d'acides nucléiques (Midoux et al, 2009)

D'une part, de tels polymères, peptides et lipides ont été développés pour induire une déstabilisation membranaire en milieu acide, correspondant au pH de la lumière des vésicules d'endocytose (endosomes) afin de libérer les acides nucléiques dans le cytosol. Bien que les mécanismes supposés, c'est-à-dire, la perméabilité de la membrane, la fusion membranaire ou l'effet éponge à protons, n'ont pas encore été identifiés, la plupart des transporteurs sont inefficaces en présence de **bafilomycine A1** qui inhibe l'acidification des endosomes.

D'autre part, les lipides cationiques contenant une tête imidazole ayant une charge positive constante (un cation soit imidazolium soit imidazolium) ont donné des efficacités prometteuses.

Les niveaux de transfection sont toujours inférieurs à ceux des virus qui montrent une capacité extraordinaire d'échapper aux endosomes, tandis que les polyplexes et les lipoplexes restent majoritairement séquestrés dans les vésicules d'endosomes/lysosomes.

Les acides nucléiques sont les autres constituants de ces systèmes de délivrance. Contrairement aux **ARN** et aux **oligonucléotides**, dont les cibles sont dans le cytosol ou

pouvant passer facilement les pores nucléaires, les **ADN plasmidiques** doivent être importés de façon active dans le noyau pour que les gènes soient exprimés.

A cette fin, une stratégie prometteuse pourrait être l'utilisation d'ADN contenant des **sites NFkB**, dont il a récemment été montré qu'ils augmentaient le nombre de copies de plasmides dans le noyau et l'efficacité de transfection des polyplexes (Mesika et al, 2001; Mesika et al, 2005; Midoux et al, 2008).

L'utilisation de signaux de localisation nucléaire de l'antigène SV40 ne donne pas les bénéfices attendus pour aider l'import d'ADN dans le noyau (Wagstaff & Jans, 2007).

La capacité à favoriser la sortie des endosomes n'a pas encore été démontrée au niveau cellulaire. La quantification qui est difficile à mettre en oeuvre et requiert le développement de sondes intracellulaires pourra ouvrir de nouvelles perspectives sur l'utilisation de l'imidazole.

▪ Translocation nucléaire et lien avec le cycle cellulaire

Le routage du plasmide et/ou du complexe depuis la sortie de l'endosome jusqu'au noyau est une étape mal connue et sans doute la plus limitante. Les différentes barrières de ce passage périlleux sont rappelées sur ce schéma (Lechardeur & Lukacs, 2006).

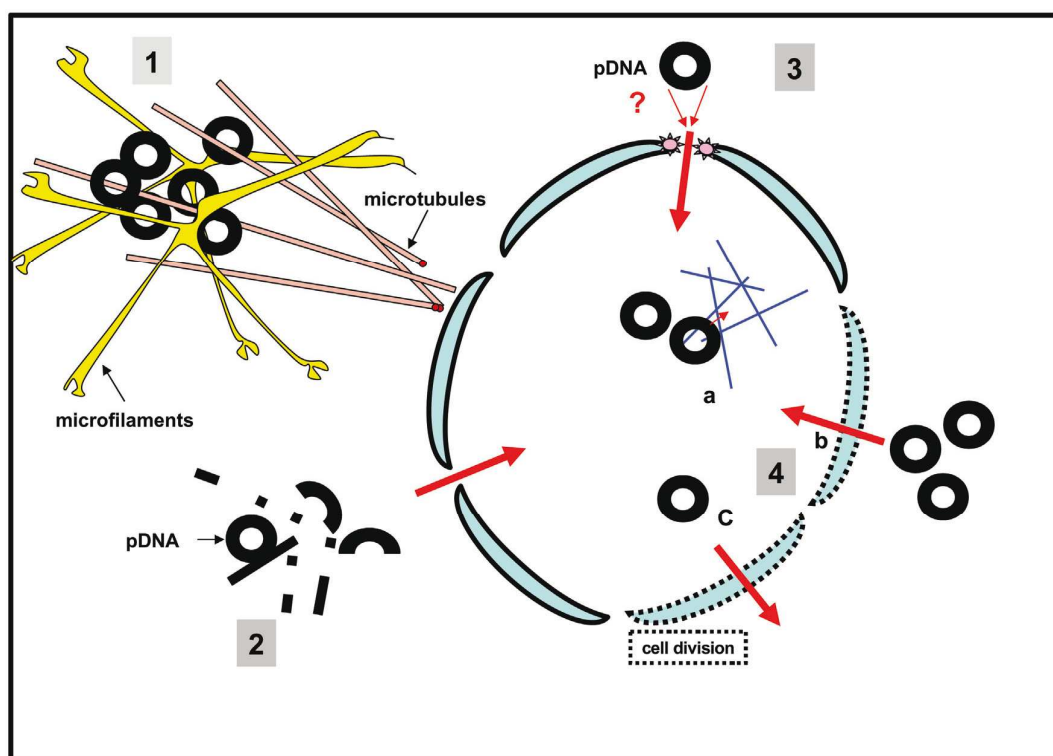


Figure 107. Représentation schématique des barrières cellulaires du trafic nucléocytoplasmique de l'ADN plasmidique.

1. L'encombrement des molécules du cytosquelette restreint la mobilité de l'ADN dans le cytoplasme
2. Dégradation de l'ADN par les nucléases actives du cytosol
3. Efficacité de translocation de l'ADN restreinte
4. Activité transcriptionnelle limitée de l'ADN dans le noyau.

La transcription de l'ADN est influencée par les interactions avec les composants de la matrice nucléaire (a). Jusqu'au désassemblage de l'enveloppe nucléaire, l'entrée (b) et la sortie (c) de l'ADN du noyau peuvent arriver (Lechardeur & Lukacs, 2006).

Peu d'informations sont disponibles sur l'étape entre la sortie de l'endosome et la translocation nucléaire. Si les **complexes** sont microinjectés directement dans le noyau, ils n'induisent pas de taux de transfection élevés, l'ADN doit donc être libéré avant l'entrée dans le noyau. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de la T7 polymérase, qui a permis la transcription du gène rapporteur dans le cytoplasme.

La translocation nucléaire repose sur le franchissement du pore nucléaire par l'ADN plasmidique. Le diamètre théorique d'un pore est de 10 à 40 nm, tandis que l'ADN plasmidique a une taille certes inférieure à 50 nm mais probablement supérieure à celle du pore (figure 108).

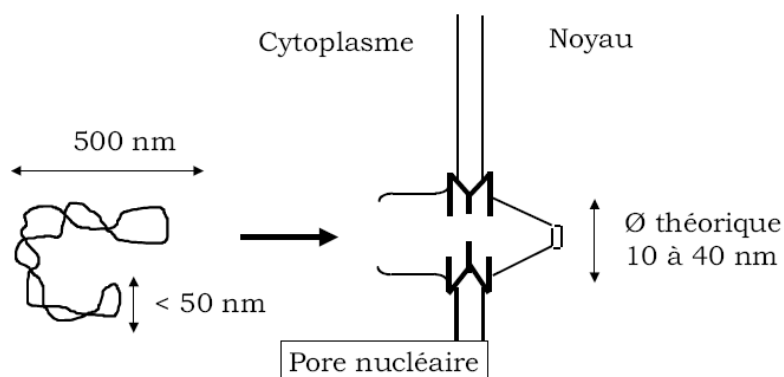


Figure 108. Pore nucléaire.

Les solutions ont donc été proposées comme des techniques cellulaires pour l'étude de l'import nucléaire de molécules, la technique de microinjection cytoplasmique et nucléaire et parallèlement la technique des cellules perméabilisées par un traitement à la digitonine (Escriu et al, 2001).

Cependant, l'étude de la translocation nucléaire est dépendante du cycle cellulaire. Des expériences de transfection sur cellules HeLa synchronisées ont apporté quelques résultats allant dans ce sens (figure 109). Une fois les cellules synchronisées, l'effet de la position dans le cycle sur l'efficacité de transfert de gènes est analysé.

Effet de la position dans le cycle sur l'efficacité de transfert de gène

Intervalle de temps	Activité luciférase (pg luciférase / pg protéine)	%	Répartition des cellules dans le cycle à la fin de l'intervalle (%)			
			G0/G1	S	G2/M	
Contrôle	1,43 ± 0,81	100	58	33	9	0h
0h - 4h	0,20 ± 0,15	14	1	92	7	2h
2h - 6h	0,65 ± 0,56	45	3	54	43	4h
4h - 8h	0,72 ± 0,31	51	14	30	56	6h
6h - 10h	1,44 ± 0,17	101	36	29	34	8h
8h - 12h	13,54 ± 2,30	949	73	15	12	10h
						12h

Figure 109. Effet de la position dans le cycle sur l'efficacité du transfert de gènes.

Le franchissement du pore nucléaire par un ADN plasmidique est un événement très rare. Lorsqu'une cellule passe par une étape de mitose, l'efficacité de transfert de gènes est considérablement augmentée (Brunner et al, 2000). Lors de la mitose, l'enveloppe nucléaire est désorganisée et permet l'intrusion de macromolécules. En revanche, ce n'est pas le cas pour la transfection avec le PEI linéaire et l'électroporation qui présente l'intérêt de créer des pores à la fois au niveau des membranes plasmique et nucléaire (Brunner et al, 2002).

L'équipe de P. Midoux a réalisé des comptages du nombre de plasmides dans le noyau, avec des résultats doublés lorsque le complexe porte une histidine qui facilite la déstabilisation membranaire de l'endosome et passage dans le cytosol pour gagner le noyau. Des noyaux ont été étudiés au FRET et au FRAP indiquant curieusement la

persistance de polyplexes et donc de polymères dans le noyau. La question est de comprendre comment ces complexes ont pu pénétrer dans le noyau en dépit d'une forte condensation sachant qu'un polyplexe mesure 100 nm et un pore nucléaire 20 nm de diamètre. Cette observation est d'autant plus étonnante qu'elle a été réalisée pendant un temps très court, c'est-à-dire sans division cellulaire. La translocation nucléaire du PEI-His est donc indépendante de la division cellulaire (Midoux. Conférence « Le Trafic intracellulaire des complexes ADN/vecteurs synthétiques », Brest, 2007).

La dissociation des complexes oppose encore à l'heure actuelle les auteurs, il n'y a pas de réponse claire quant à la libération de l'ADN du vecteur avant ou après la translocation nucléaire.

En dehors de la mitose, l'entrée dans le noyau ne peut généralement se faire que par les complexes de pores nucléaires appelés NPC, canaux étroits qui permettent la diffusion passive des petites molécules (< 9 nm de diamètre) ou le transport actif des plus grandes (< 28 nm). Les **cellules en division** sont donc plus facilement transfectables que les cellules quiescentes.

Le schéma ci-dessous (figure 110) résume le mécanisme d'entrée dans le noyau par les pores nucléaires (Morille et al, 2008). Il est indéniable que les complexes macromoléculaires utilisent le cytosquelette pour gagner le noyau, notamment le réseau de microtubules et les microfilaments (Campbell & Hope, 2003).

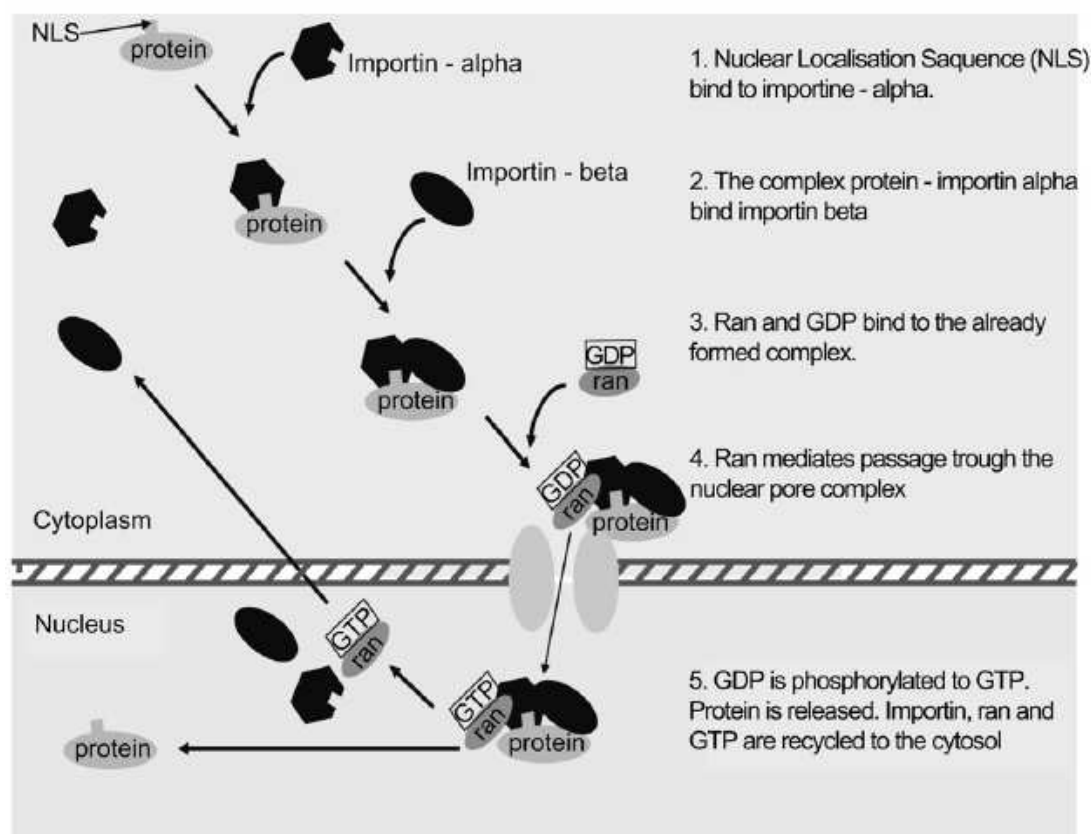


Figure 110. Représentation schématique du mécanisme d'entrée nucléaire par les complexes des pores nucléaires (Morille et al, 2008).

D'autres études mécanistiques sont nécessaires pour comprendre où et comment ont lieu la libération de l'ADN et son transport dans le noyau ainsi que sa prise en charge par la machinerie de transcription.

Différents types de liposomes ont été créés et leur capacité de transfection évaluée. D'une manière générale les liposomes composés de **lipides neutres** ou **anioniques** ont une efficacité de transfection moindre **in vivo** même s'ils se révèlent être de bons vecteurs d'ADN **in vitro** (Soriano et al, 1983).

c. Vectorisation par polymères

▪ Structure

Outre les liposomes, il existe une autre catégorie de vecteurs synthétiques appelés polymères. Ils sont formés à partir de polymères cationiques qui peuvent se complexer à l'ADN. Ces polyplexes se comportent comme les lipoplexes bien que leur structure facilite le **greffage de ligands** qui permettent de cibler un type cellulaire et une **internalisation par un récepteur membranaire**.

Ils présentent une forte efficacité de transfection grâce à leur pouvoir tampon empêchant la dégradation des complexes dans le lysosome et à leur faible toxicité.

Leur intérêt est également de pouvoir ajouter des polyhistidines ou polyplexes pH-sensibles pour augmenter la sortie des complexes de l'endosome et de libérer ADN en fonction de la température.

Les polymères cationiques constituent la seconde grande classe de vecteurs synthétiques, ils sont représentés principalement par quatre grandes familles : la polyéthylénimine (PEI), la poly-L-lysine (PLL), les dendrimères et le chitosan (figures 111 et 112).

C'est en 1991 que Kabanov introduit ce nouveau type de complexes, appelé **polylysine**, notamment dans la revue Biopolymers (Kabanov et al, 1991). En 2003, il démontre son efficacité en matière de transfection et de perméabilisation cellulaire (Yaroslavov et al, 2003).

C'est en 1995 que l'équipe de Behr démontre l'efficacité d'un nouveau vecteur pour le transfert de gènes et d'oligonucléotides dans les cellules en culture et in vivo, appelé le **polyéthylénimine** (PEI) qui est un polymère cationique (Boussif et al, 1995).

L'équipe de Midoux a prouvé l'efficacité du transfert de gènes spécifiques des cellules d'hépatomes par l'utilisation de la poly-L-lysine lactosylé (Midoux et al, 1993) et plus généralement dans les cellules par les polymères (Midoux et al, 2008; Midoux et al, 2009; Pichon et al, 2001).

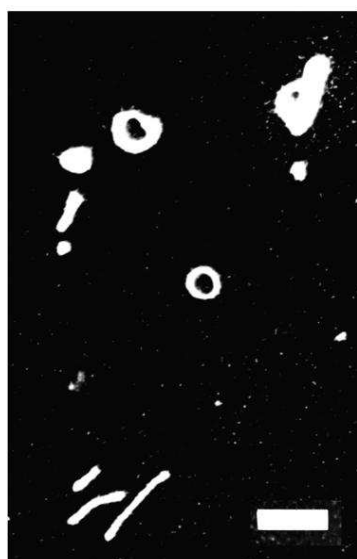


Figure 111. Photo de la condensation de l'ADN par la polylysine. La forme d'anneaux rappelle les « donuts » (microscopie électronique à transmission). Cette architecture protège ainsi l'ADN des nucléases. Barre = 100 nm (Pichon et al, 2001).

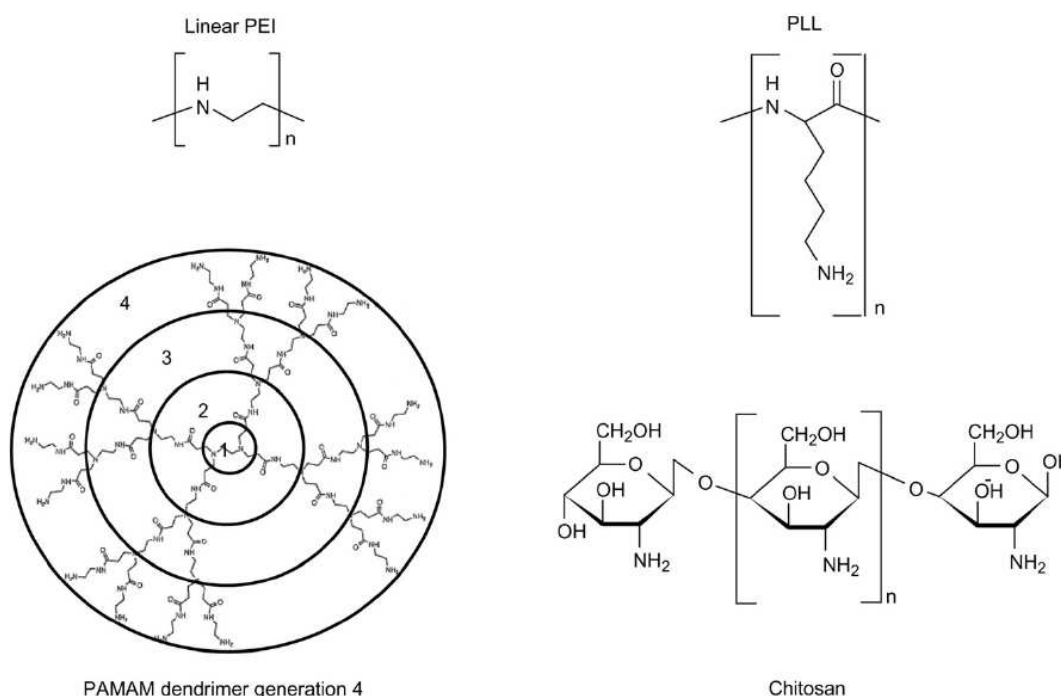


Figure 112. Structures chimiques des polymères PEI, PLL, PAMAM et chitosan.

Le **PEI** peut être synthétisé dans différentes longueurs, être branché ou linéaire. Sa supériorité en matière d'efficacité de transfection lui confère une place privilégiée parmi les polymères. Le PEI linéaire de faible poids moléculaire est le plus efficace et le moins cytotoxique. La propriété d'inhibition de la pompe à protons par ses fonctions amines internes permet au PEI de sortir des endosomes et des lysosomes. Cependant, *in vivo*, les grandes quantités de charges positives et leur non biodégradabilité rendent les polymères de PEI trop toxiques. Par conséquent, des essais sont en cours pour améliorer le ciblage et diminuer les charges de surface, d'autant que le PEI est efficace *in vivo* dans le cerveau et le poumon.

La **PLL**, **premier polymère** développé, est quant à elle biodégradable en raison de sa structure peptidique, ce qui constitue un atout *in vivo*. Lorsque les polyplexes PLL/ADN sont internalisés, leur efficacité de transfection reste modeste et est accompagnée d'une toxicité notable. De faible poids moléculaire (moins de 3 kDa), des complexes stables ne pouvaient se former. Aussi, un analogue dégradable appelé **PAGA** a été synthétisé, le niveau de transfection est élevé et la toxicité indétectable.

Le **chitosan** provient de la désacétylation de la chitine, un polysaccharide trouvé dans l'exosquelette des insectes et des crustacés, il est biodégradable et biocompatible. Sa nature polycationique lui procure de fortes interactions électrostatiques avec le mucus, chargé négativement, les siRNA et l'ADN. Il a été intégré dans la composition de nanoparticules auxquelles un ou des ligands ont été greffés.

Les **dendrimères**, de forme sphérique, présentent une structure arborescente, ce qui leur confère une structure tridimensionnelle très hiérarchisée. Le cœur de la molécule est le centre à partir duquel les monomères se ramifient d'une manière ordonnée et symétrique. Les plus couramment utilisés sont les polyamines, polyamides ou polyesters, mais le plus fréquent est le polyamidoamine (PAMAM) pour son efficacité de transfection élevée sans toxicité importante. La forte efficacité de transfection est permise par les fonctions amines, non protonnées à pH physiologiques et qui peuvent jouer le rôle d'éponge à protons dans l'endosome, ce qui évite la dégradation des complexes dans les lysosomes.

■ Mécanisme de la polyfection

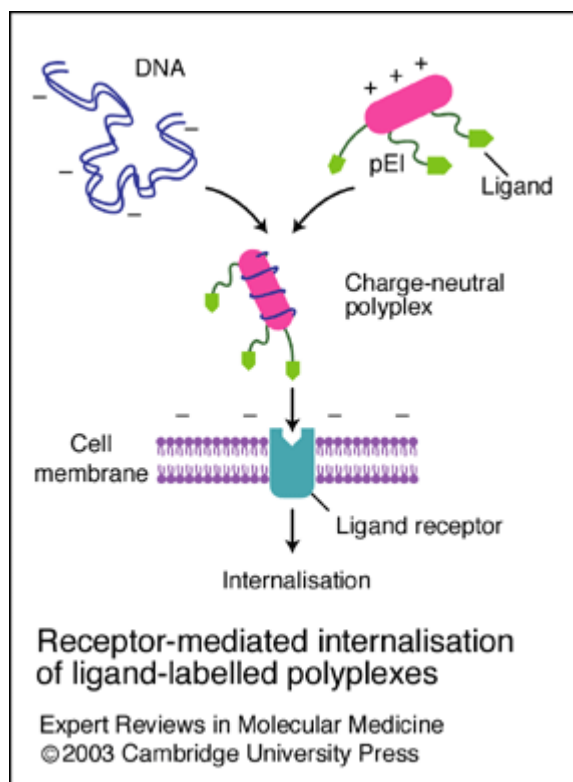


Figure 113. Polyfection.

L'ADN chargé négativement se complexe au polymère cationique de charge positive, ici le PEI qui porte un ligand pour former un polyplexe de charge neutre.

L'internalisation est médiée par un récepteur qui reconnaît le ligand à la surface de la cellule, chargée négativement.

D'après Parker, Newman, Briggs, Seymour, Sheridan.

Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003.

<http://www.expertreviews.org/>

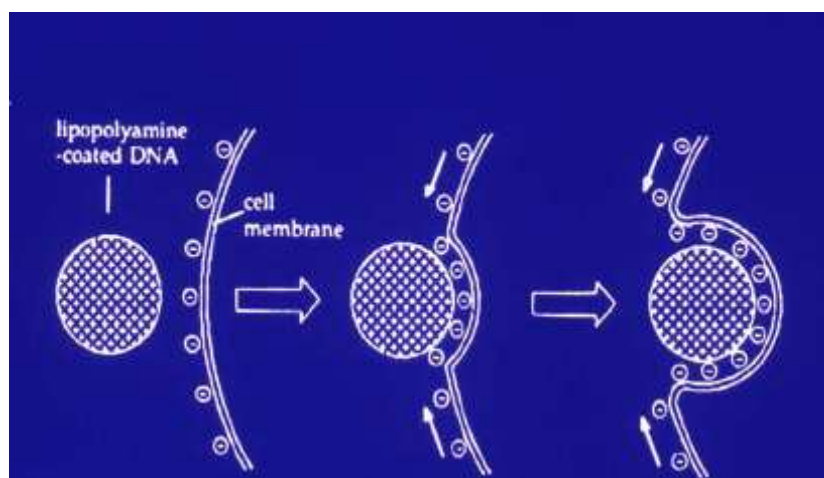


Figure 114. Endocytose non-spécifique d'un lipoplexe (lipopolyamine/ADN)

D'après Lehn, 3^{ème} Carrefour OUEST-Genopole®, Brest, 2006.

L'ADN chargé négativement se complexe au polymère chargé positivement tel le PEI qui porte un ligand pour former un polyplexe de charge neutre. L'endocytose peut être spécifique, l'internalisation est médiée par un récepteur qui reconnaît le ligand à la surface de la cellule. L'endocytose peut également être non-spécifique, si bien que le polyplexe est internalisé sans reconnaissance ligand/récepteur (figures 113 et 114).

Des vecteurs couplant les liposomes et les polymères ont également été conçus, ils sont appelés les lipopolymères.

d. Nanovecteurs

Au début du XX^e siècle, le savant allemand **Paul Ehrlich**, prix Nobel de médecine 1908 et considéré comme le père de la chimiothérapie, imaginait déjà du « **magic bullet** » susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. En constatant que des médicaments efficaces pouvaient aussi être très toxiques, Ehrlich a consacré une partie de ses travaux à rechercher un moyen d'obtenir des médicaments qui "tuent" la cause de la maladie et non la personne malade (Strebhardt & Ullrich, 2008). Aujourd'hui, grâce au développement des **nanotechnologies** qui ont permis de proposer le concept de **vectorisation des médicaments**, ce concept est proche de la réalité (Annexes 12 et 14). Directeur de l'Unité "Physico-chimie, pharmacotechnie et biopharmacie" (Université Paris XI/CNRS) et professeur à l'Université Paris-Sud UMR CNRS 8612, **P. Couvreur** fut le premier à introduire le concept de vecteur nanoparticulaire biodégradable pour l'administration de molécules pharmacologiquement actives et est à l'origine des avancées récentes de son équipe qui ont conduit notamment à la création de la start-up Bioalliance Pharma.

Par **nanomédicament**, on entend la conception d'un **vecteur de taille nanométrique** capable d'amener une molécule active sur une cible thérapeutique donnée : un gène, une protéine, une cellule, un tissu ou un organe. Le défi de la nanomédecine est double : **transporter** le médicament (**vectorisation**) et **cibler** l'endroit précis où il sera utile (**ciblage**). L'utilisation des nanotechnologies (nanoparticules, liposomes, micelles, etc.) permet, en maîtrisant la distribution des médicaments à l'échelle tissulaire et cellulaire, d'en augmenter l'efficacité et d'en réduire la toxicité. Il sera possible d'insérer ou d'encapsuler une molécule biologiquement active dans un nanovecteur et de s'affranchir ainsi des propriétés physicochimiques du médicament. Les nanovecteurs permettent d'augmenter par le ciblage l'efficacité d'une biomolécule, d'en diminuer la quantité et la toxicité.

Avec Speiser, Couvreur a montré qu'il était possible d'utiliser des capsules submicroscopiques d'une centaine de nanomètres pour promouvoir la pénétration intracellulaire de médicaments (Couvreur et al, 1977). L'équipe de Couvreur travaille sur la galénique, le mode d'administration des médicaments. Ces chercheurs développent le concept de vectorisation qui consiste à encapsuler des molécules thérapeutiques dans des nanovecteurs (70 fois plus petits qu'un globule rouge) afin de multiplier leur pouvoir de diffusion et d'accroître de plusieurs ordres de grandeur leur efficacité. Les polymères composent les nanovecteurs, appelés nanocapsules et nanosphères. Les nanovecteurs sont en général plus petits que les liposomes.

Un comprimé d'1 gramme de poudre présente une surface de quelques millimètres carrés ; le même gramme de substance éclaté en nanoparticules présente une surface d'environ 100 m². Les nanomédicaments présentent donc une surface d'interaction avec les milieux vivants beaucoup plus importante que les formes pharmaceutiques traditionnelles. Il a fallu attendre la conception de nanoparticules biodégradables préparées à partir de polycyanoacrylates d'alkyle, un polymère métabolisable (Couvreur et al, 1979) pour les tester chez l'Homme. Ce nouveau vecteur biodégradable a pu être associé à plusieurs **agents anti-cancéreux**, comme la **doxorubicine**.

La doxorubicine est un médicament anti-cancéreux, efficace mais entraînant une insuffisance cardiaque. Quand entre 5 et 7,5 mg par kg sont injectés, sous une forme non vectorisée, certaines souris meurent du fait de la toxicité du médicament. En revanche, 2,5 mg par kg inséré dans le nanovecteur et injecté aux souris permet de réduire de près de 70% le nombre de métastases hépatiques. Avec 5 mg par kg, les souris sont pratiquement débarrassées de leurs métastases. Le plus remarquable est qu'à des doses vectorisées se situant entre 7,5 et 10 milligrammes par kg, aucun décès n'est enregistré du fait de la toxicité du médicament sur des tissus sains.

L'efficacité de ces nanovecteurs a également été démontrée sur plusieurs cancers expérimentaux (métastases hépatiques et leucémies). En outre, ces nanoparticules chargées en doxorubicine se sont avérées capables de **supprimer la résistance multidrogue** responsable des résistances aux chimiothérapies (de Verdiere et al, 1997). En 2007, un essai clinique multicentrique de phase III a commencé.

Pour des tumeurs hépatiques, l'administration intraveineuse du nanomédicament anticancéreux permettra le ciblage direct de ce tissu. En effet, lorsqu'ils sont en contact avec le sang, tous les systèmes nanoparticulaires sont opsonisés (c'est-à-dire recouverts de certaines protéines plasmatiques appelées opsonines) et reconnus par les cellules de Küpffer du foie. A titre d'exemple, le Doxil[®] est une formulation pharmacologique constituée de doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés, mieux tolérés (moindre toxicité cardiaque) que la doxorubicine. Les indications en sont le cancer de l'ovaire, le myélome multiple et le sarcome de Kaposi. Développées par BioAlliance Pharma, les nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) chargées en doxorubicine (Transdrug[®])(figure 115) font aujourd'hui l'objet d'essais cliniques de phase III en Europe pour le traitement des hépatocarcinomes résistants (figure 116), une forme de tumeur du foie pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement et dont le pronostic est très sévère.

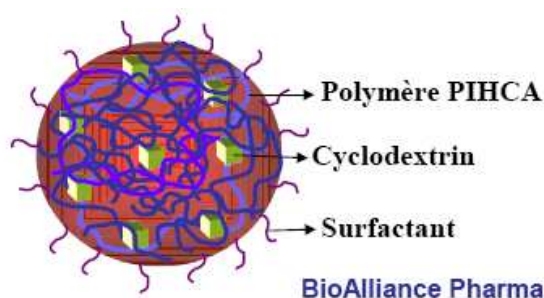


Figure 115. Nanoparticule Transdrug[®].

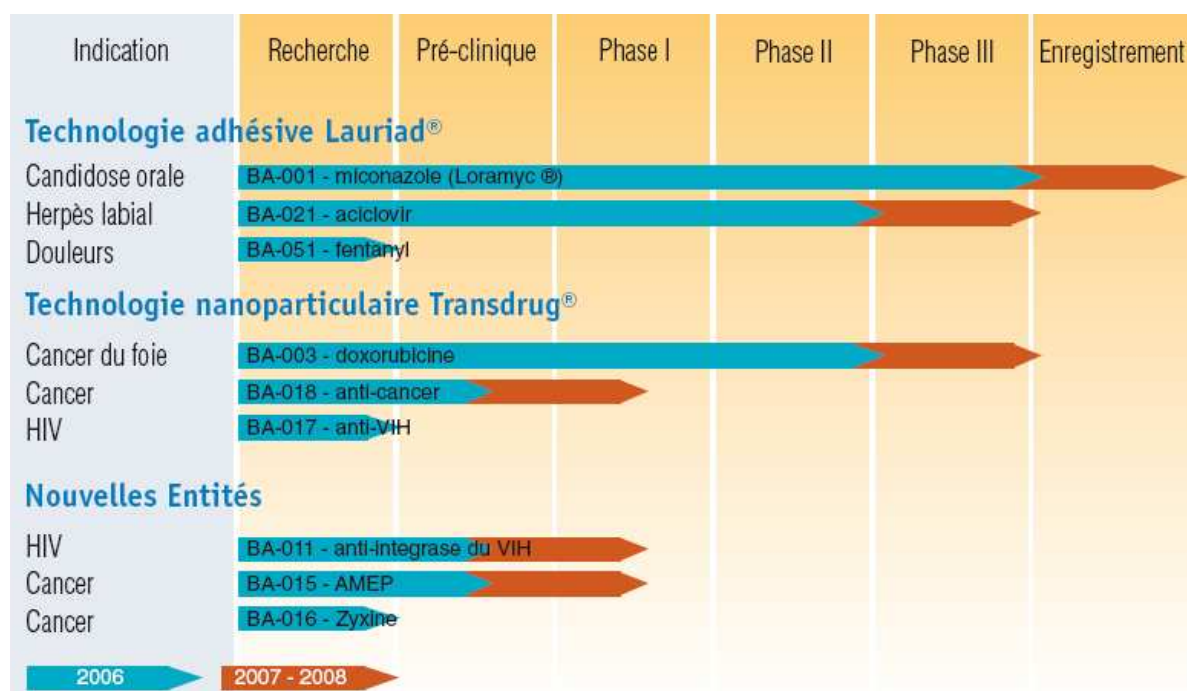


Figure 116. Phases des essais cliniques des nanomédicaments de BioAlliance Pharma.

Les applications thérapeutiques concernent principalement le traitement du cancer, des infections intracellulaires et des maladies métaboliques. Le développement de nouveaux vaccins fait aussi appel à ces technologies.

Aujourd'hui, divers nanomédicaments sont approuvés par les autorités de santé aux Etats-Unis et en Europe (Site de l'Académie Nationale de Pharmacie <http://www.acadpharm.org/>).

Bien que leur nombre est encore faible, en voici quelques exemples :

- Des nanoparticules d'oxyde de fer (Endorem[®], Feridex[®], Resovist[®]) destinées à l'imagerie diagnostique en Imagerie de Résonance Magnétique (IRM).
- Plusieurs médicaments anti-cancéreux sont actuellement commercialisés sous forme nanoparticulaire (Ambisome[®], Oncospar[®], PEG-Intron[®], PEGSYS[®], Neulasta[®], Abraxane[®], Doxil[®]/Caelyx[®]). Doxil[®] et Caelyx[®] sont des formulations liposomales de la doxorubicine, à la différence que Caelyx[®] est PEGylé.
- Une capsule endoscopique permettant d'accéder de façon non invasive à la lumière du tube digestif et de porter un diagnostic sur la paroi de l'intestin. La capsule PillCam Côlon[®] (Given Imaging Ltd, Yoqneam, Israël) a été homologuée comme dispositif médical par Santé Canada en janvier 2007. Plusieurs dizaines de milliers de patients ont déjà bénéficié de cette technologie.

Mais la plupart des applications médicales des nanotechnologies relèvent du domaine de la recherche et du développement, comme les nanomédicaments.

Certains essais reposent sur des encapsulations à l'intérieur de structures nanométriques organiques ou inorganiques telles que les fullerènes, micelles, liposomes ou de nanotubes de carbone (figure 117). D'autres travaux portent sur des nanoparticules magnétiques que l'on pourrait guider de l'extérieur de l'organisme par application d'un champ magnétique focalisé sur la zone à traiter. On peut aussi citer les nanoparticules d'or par exemple qui, fixées sur des tumeurs, se révèlent capables de potentialiser la radiothérapie de façon très notable.

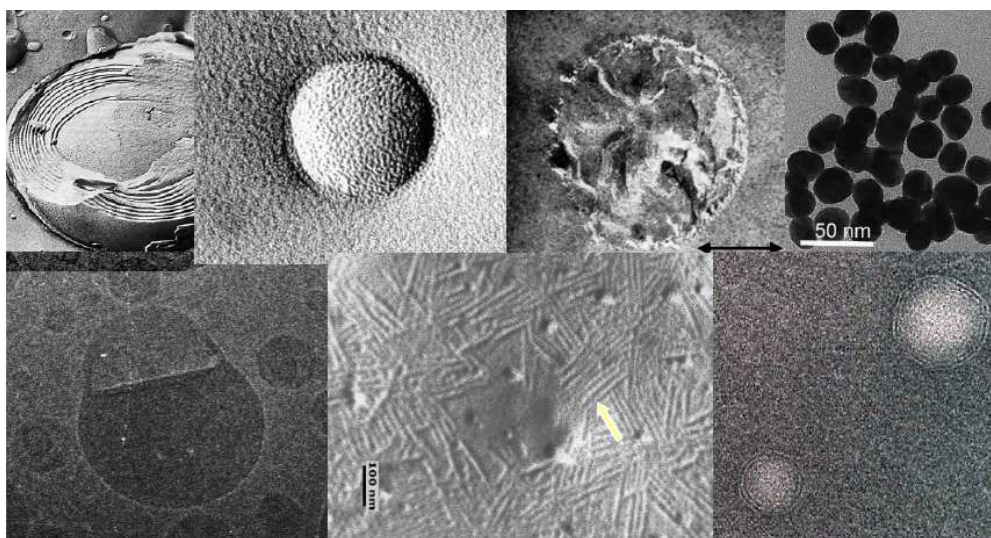


Figure 117. Les différents types de nanovecteurs (de gauche à droite et de haut en bas) : Liposomes multilamellaire (500 nm), nanosphère polymère (120 nm), nanocapsule polymère (180 nm), Ultra Small Particle of Iron Oxide (USPIO) (25 nm), objet « Janus » (175 nm), cubosomes (20 nm), nanoassemblages squalénés (130 nm). © CNRS/P. Couvreur.

En dépit de ce formidable espoir, les nanotechnologies suscitent un vif débat de société évoqué dans l'article de Grognet, car elles soulèvent un certain d'interrogations liées au

domaine social à travers le coût des innovations et au domaine éthique à travers l'acceptation de ces nouveaux dispositifs (Grognet, 2008).

▪ Nanocapsules

La **nanocapsule** est une nanoparticule de type **réservoir** (figure 118). Elle est constituée d'une mince paroi de **polymère** généralement biodégradable, dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres, entourant un compartiment huileux ou aqueux qui contient le médicament. La taille d'une nanocapsule varie **entre 100 et 200 nm**.

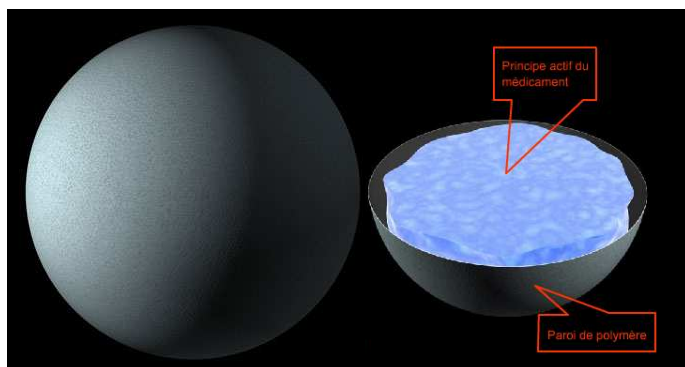


Figure 118. Représentation d'une nanocapsule.

Une nanocapsule est constituée d'une enveloppe de polymère et d'un compartiment huileux ou aqueux contenant le médicament. C'est un système de type réservoir. © sagascience/F. Caillaud

Les nanocapsules lipidiques développés dans l'unité INSERM U646 « Ingénierie de la Vectorisation Particulaire » à Angers dirigée par J.P. Benoît ont comme objectif principal la **production** et la **validation préclinique d'un nouvel outil radiothérapeutique et d'imagerie**. Les nanocapsules lipidiques sont ici des réservoirs de radionucléides, le **rhénium-188** (^{188}Re) (figures 119 et 120). Son incorporation au sein du cœur lipidique des nanocapsules est réalisée par l'intermédiaire de complexes lipophiles (Complexe SSS) conduisant à des objets à haute activité dont la formulation est entièrement automatisée.

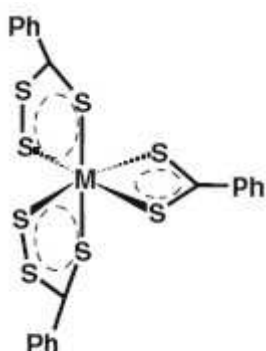


Figure 119. Structure du complexe lipophile.



Figure 120. Image TEMP après injection de nanovecteurs.

L'évaluation thérapeutique de ces nanocapsules sur des tumeurs gliales ou hépatiques montre une activité antitumorale élevée (<http://www.u646.angers.inserm.fr/>).

▪ Nanosphères

La **nanosphère** est une nanoparticule constituée d'un **polymère enchevêtré** formant un réseau (figure 121), ce polymère étant de préférence biodégradable. Le médicament

est dispersé ou dissous dans la matrice polymère. Son principe actif sera libéré par simple diffusion vers l'extérieur ou à la suite de sa biodégradation dans l'organisme. La taille d'une nanosphère varie **entre 100 et 200 nm**.

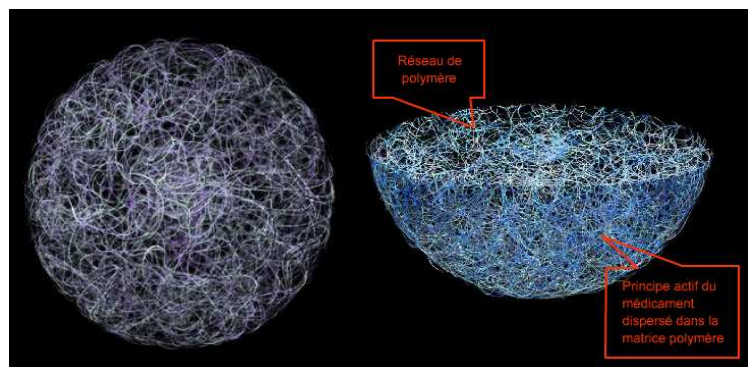


Figure 121. Représentation d'une nanosphère.

Il s'agit de polymères enchevêtrés pour former un réseau matriciel (de type "pelote de laine") dans lequel le médicament est piégé (ici en violet). © sagascience/F. Caillaud

▪ Les nanovecteurs en pratique

En pratique, les principes actifs sont préférentiellement véhiculés dans une structure de type polymère incluant les nanovecteurs, tandis que les acides nucléiques et oligonucléotides sont plus généralement véhiculés dans un liposome (figure 122).

LIPIDES CATIONIQUES	NANOSPHERES
Potentiel Zéta > 0	Potentiel Zéta < 0
« Lasagnes » : ADN enfoui, structure multilamellaire	« Bolognaise »
Ensemble +	Ensemble -
100-150 nm	50 nm

EFFICACITE SELON LA STRATEGIE ET LA CIBLE		
IN VIVO	Nanosphères lipidiques électroneutres et furtives, décorées de chaînes PEG et d'un LIGAND contenant lipides et ADN	
IN SITU	Nanosphères polymères	
IN VITRO	Lipides cationiques	

Figure 122. Choix du nanovecteur selon la stratégie. D'après Pitard, Congrès Gen2Bio, Angers, 2007.

e. Peptides

Durant les dix dernières années, un certain nombre de **peptides** (Cell Penetrating Peptide, **CPP**) ou **petites protéines** (Protein Transduction Domain, **PTD**), pouvant traverser la membrane plasmique des cellules eucaryotes ont été utilisés pour vectoriser des macromolécules (figure 123). Certaines de ces séquences dérivent de protéines naturelles telles que des protéines de surface de virus et bactéries.

Agents de translocation	Séquence d'acides aminés	Origines
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia
Tat (48-60)	GRKKRRQRRPPQC	HIV-1
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanine et Mastoparan
Peptide amphiphile	KALKLALKALKAALKLA	Synthèse
Arg ₉	RRRRRRRRR	Synthèse

Figure 123. Peptides vecteurs et leurs origines.

Ces peptides ont été conjugués à un grand nombre de composés et ont permis la vectorisation cellulaire de petites molécules, de peptides, de protéines, d'acides nucléiques et de nanoparticules, avec une grande efficacité de vectorisation in vitro et in vivo chez le petit animal. Leurs mécanismes d'internalisation ne sont pas toujours clairement élucidés.

Ces vecteurs « agents de ciblage multivalents » sont donc particulièrement intéressants, c'est pourquoi de nombreuses équipes cherchent à concevoir des molécules de ce type.

La vectorisation de protéines recombinantes portant un motif peptidique capable d'induire la mort des cellules transformées est une approche originale et prometteuse contre le cancer. Le laboratoire de D.Michel à Rennes (UMR CNRS 6026) travaille en recherche fondamentale sur le rôle des chaperons et co-chaperons au cours de stress du réticulum endoplasmique (Loison et al, 2006; Loison et al, 2005; Nizard et al, 2007), le trafic intracellulaire de ces protéines et leur dégradation via le système ubiquitine protéasome. Il a été entrepris de produire des protéines thérapeutiques chimères formées de domaines empruntés à plusieurs protéines naturelles humaines ou issues de micro-organismes. L'exemple de protéines naturelles, comme les **toxines** «AB» d'origines bactérienne et végétale, démontre que des polypeptides circulants peuvent être prélevés par les cellules eucaryotes et y perturber le fonctionnement de cibles moléculaires localisées dans le cytosol et/ou d'induire la mort cellulaire. Le projet illustré par le schéma suivant s'inscrit dans une stratégie anti-tumorale basée sur la production de protéines thérapeutiques chimères possédant des domaines permettant :

- Le ciblage de la fixation d'un ou plusieurs types cellulaires cancéreux ou immunitaires
- L'internalisation par endocytose
- La prise en charge et une protéolyse « contrôlée » par le système ERAD (endoplasmic reticulum associated protein degradation)
- La libération d'un peptide bioactif

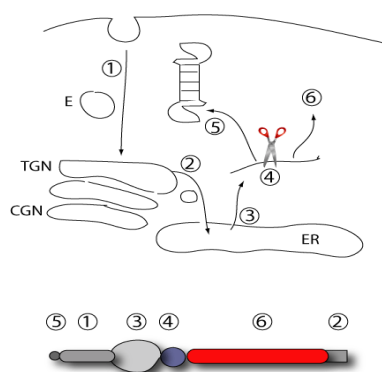


Figure 124. Schéma du trafic intracellulaire de la protéine chimère et sa protéolyse « sélective » permettant de libérer le peptide bioactif.

Le polypeptide bioactif (rouge), pour être transporté au sein de la cellule, est inclus dans une protéine recombinante. Etape (1) Entrée dans la cellule par endocytose médiée par un récepteur jusqu'au réseau trans-golgien (TGN). Etape (2) Rétro-translocation des protéines du TGN au réticulum endoplasmique (ER). Etape (3) Étape la plus limitante d'export du ER au cytosol reposant sur le système ERAD ("endoplasmic reticulum-associated degradation"). Etape (4) Relargage du cargo du vecteur par les DUB (De-UBiquitinasés) cytosoliques. Etape (5) Dégradation programmée du produit de clivage par les DUB. Etape (6). Libération et interaction du polypeptide transporté avec la cible moléculaire.

<http://www.umr6026.univ-rennes1.fr/IPCweb/index.html>

Lorsque le peptide est un motif pro-apoptotique, il pourrait induire la mort cellulaire par apoptose dans les cellules cancéreuses. La majorité des toxines « AB » emprunte une voie intracellulaire dite « transport rétrograde » qui passe par l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE), et dont l'étape la plus limitante est le transfert entre le RE et le cytosol. De plus, ces constructions chimériques protéiques à fort potentiel d'export du RE permettent d'étudier d'un point de vue fondamental, le trafic intracellulaire des protéines en particulier le passage de protéines de la voie de sécrétion vers le cytosol.

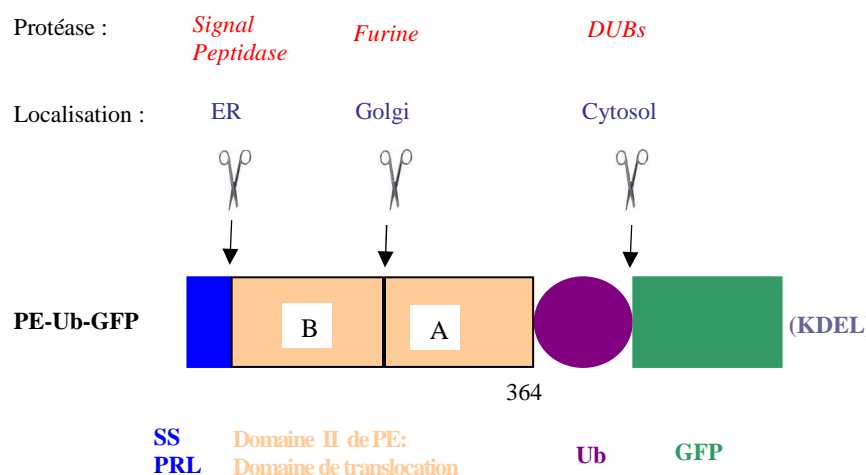


Figure 125. Représentation schématique de la séquence chimérique codant une protéine de fusion composée, de l'extrémité amino- à carboxy terminale : de la séquence signal de la prolactine (SS PRL, cassette bleue), du domaine de translocation de l'Exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (cassettes B et A en beige), d'un domaine ubiquitine (cercle violet) et de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein, en vert). Dans l'une des constructions, le motif KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique est ajouté à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine de fusion (Nizard et al, 2007).

Ce schéma décrit la protéine chimère composée de la séquence signal de la prolactine favorisant l'entrée dans la cellule de cette protéine par fixation à un récepteur présent sur toutes les cellules. Le reste de la protéine chimère est composé d'un candidat de rétrotranslocation (le domaine II de l'Exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* ou du domaine de la ricine, (Beaumelle et al, 2001)), un domaine ubiquitine, la séquence du peptide thérapeutique (ici, la GFP) et enfin le motif KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique (Jackson et al, 1999). Les sites clivages par les protéases constituent les contrôles du trafic intracellulaire depuis l'entrée dans la cellule jusqu'au cytosol : La furine clive le domaine de translocation dans l'appareil de Golgi, la signal peptidase coupe la séquence signal dans le réticulum endoplasmique, des signaux de glycosylation ajoutés à la GFP permettent de vérifier le passage dans le ER, les DUBs permettent de dégrader le vecteur et relarguer le peptide d'intérêt dans le cytosol où se situe sa cible (Johnsson & Varshavsky, 1994).

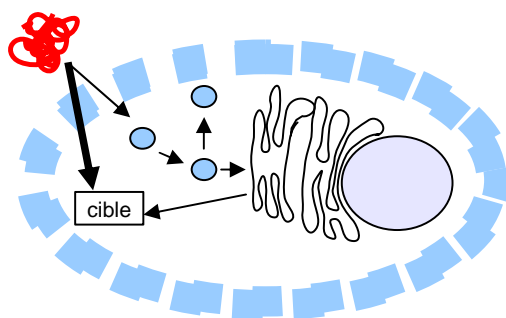


Figure 126. Vectorisation de protéines thérapeutiques recombinantes du milieu extracellulaire jusqu'au cytosol.

Les applications peuvent être le transfert de polypeptides bioactifs antitumoraux (agents cytotoxiques vectorisés dans des cellules cancéreuses) ou bien des vaccins anti-cancer recombinants à médiation cellulaire (antigènes tumoraux vectorisés dans des cellules dendritiques).

II. Applications du transfert de gènes in vitro

Les **applications du transfert** de gènes in vitro sont basées sur la **production de cellules recombinantes** ou de **protéines recombinantes**. Les travaux in vitro constituent un outil de recherche fondamentale indispensable à tout développement thérapeutique (figure 127).

Dans ce type d'applications, des transferts d'acides nucléiques (ADN ou ARN) sont réalisés dans des cellules en culture (lignées cellulaires) en utilisant des techniques de transfection avec des molécules cationiques, de l'électroporation ou des infections virales, en transfection stable ou transitoire.

La production de **cellules recombinantes** a pour but d'étudier le rôle des gènes ou encore la production de cellules ES recombinantes pour la transgénèse chez la souris (Houdebine, 2009; Niwa, 2010).

L'étude du rôle des gènes passe par la **surexpression** et/ou la **répression** de l'expression d'un gène à l'aide d'un siRNA ou d'un shRNA.

A cette fin, des vecteurs d'expression codant des gènes d'intérêt sont transfectés par différentes techniques, de façon stable ou transitoire.

Dans la plupart des applications, la transfection transitoire suffit pour obtenir suffisamment de messagers ARN et de protéines après 24 à 72 heures. L'ADN introduit ne s'intègre pas dans le génome cellulaire, il est normalement perdu au plus tard lors de la mitose. Le protocole est facile et rapide.

La transfection transitoire permet d'étudier le taux d'expression d'un gène, qui dépend de son promoteur. Si le promoteur n'est pas fort, la transcription reste difficile à détecter. A ce promoteur faible, un gène rapporteur est ajouté. Quand le gène rapporteur sera exprimé en ARNm puis traduit en protéine, cette dernière sera facilement détectable par des tests. Le taux de la protéine pourra être déterminé et donc la force du promoteur.

En revanche, certains protocoles nécessitent une transfection à long terme où le gène demeure dans le génome des cellules-mères ainsi que des cellules-filles, ce que permet la transfection stable. Le principe repose sur le criblage des clones possédant l'ADN transfecté par résistance à un antibiotique, permettant de maintenir le transgène 3 à 4

semaines. Pour ce faire, un autre gène est co-transfecté. Ce gène confère à la cellule un avantage sélectif, comme la résistance à un antibiotique (néomycine, hygromycine...). Bien que le rendement soit très faible, certaines cellules auront transloqué l'ADN exogène et l'auront intégré à leur génome. Si l'on ajoute l'antibiotique, appelé généticine ou G418, à laquelle la cellule est devenue résistante, au milieu de culture cellulaire, seules les cellules transfectées seront capables de proliférer, tandis que les autres mourront. Après application de cette pression de sélection pendant quelques passages en culture, seules les cellules transfectées de façon stable résistent et peuvent continuer à être cultivées.

Chez les espèces pour lesquelles on a isolé et cultivé des cellules embryonnaires souches appelées cellules ES, comme la souris, les cellules ES peuvent être transfectées de manière stable par un vecteur de recombinaison homologue pour créer un animal transgénique. Les applications sont l'étude d'un gène, la création de modèles de maladie mais aussi dans le domaine agroalimentaire, la résistance à un insecticide ou la production de protéines thérapeutiques dans le lait de lapine ou de vache ou le blanc d'oeuf. Les cellules ES modifiées sont transférées directement dans la cavité du blastocyste ce qui donnera un organisme chimère dont certaines cellules sont modifiées et pas d'autres. Cependant la répartition des cellules ES se faisant dans tous les types de tissus au cours du développement embryonnaire, l'ensemble des tissus de l'animal paraît transgénique. Des souris knock-out (extinction du gène) ou knock-in (remplacement du gène sauvage) peuvent ainsi être créées. L'expression peut être constitutive, spécifique d'un tissu lorsque la construction est sous la dépendance d'un promoteur tissu-spécifique, spécifique d'un stade du développement ou encore inducible grâce au système Cre/LoxP.

Pour l'extinction de l'expression d'un gène, des siRNA ou des shRNA sont transfectés à l'aide de ces mêmes techniques. Les siRNA sont utilisés en transfection transitoire car lors des divisions cellulaires, les siRNA se perdent entraînant un effet knock down transitoire. Les shRNA s'intègrent dans le génome de la cellule et sont donc utilisés en transfection stable.

Quant à la production de **protéines recombinantes**, que ce soit en bactéries, dans les cellules d'insectes, de levures ou de mammifères, elle a pour objectif de produire des protéines qui sont utilisées ensuite dans des **tests acellulaires** ou **sur d'autres cellules en culture** ou encore à des **fins thérapeutiques**. La définition correspond en effet à la fabrication par ces cellules d'une protéine ayant un intérêt, suivie de sa purification puis de son injection au patient dans le cas des protéines thérapeutiques. La protéine ainsi produite est appelée recombinante. Les protéines recombinantes ont donc des applications en recherche fondamentale et dans le développement thérapeutique. Aujourd'hui, plus de 160 protéines recombinantes ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché en Europe (Walsh, 2005) : hormones comme l'insuline (depuis 20 ans), l'érythropoïétine, ou les hormones thyroïdiennes, enzymes métaboliques comme l'urate oxydase, interférons, cytokines et facteurs de croissance, facteurs de coagulation comme les facteurs VII ou VII, protéines permettant la coagulation, manquantes chez les hémophiles A. La production de ces protéines par génie génétique a permis d'en disposer en abondance et sans risque de contamination, soit pour se substituer à la protéine naturelle auparavant extraite, soit pour de nouveaux usages thérapeutiques, dans le cancer notamment.

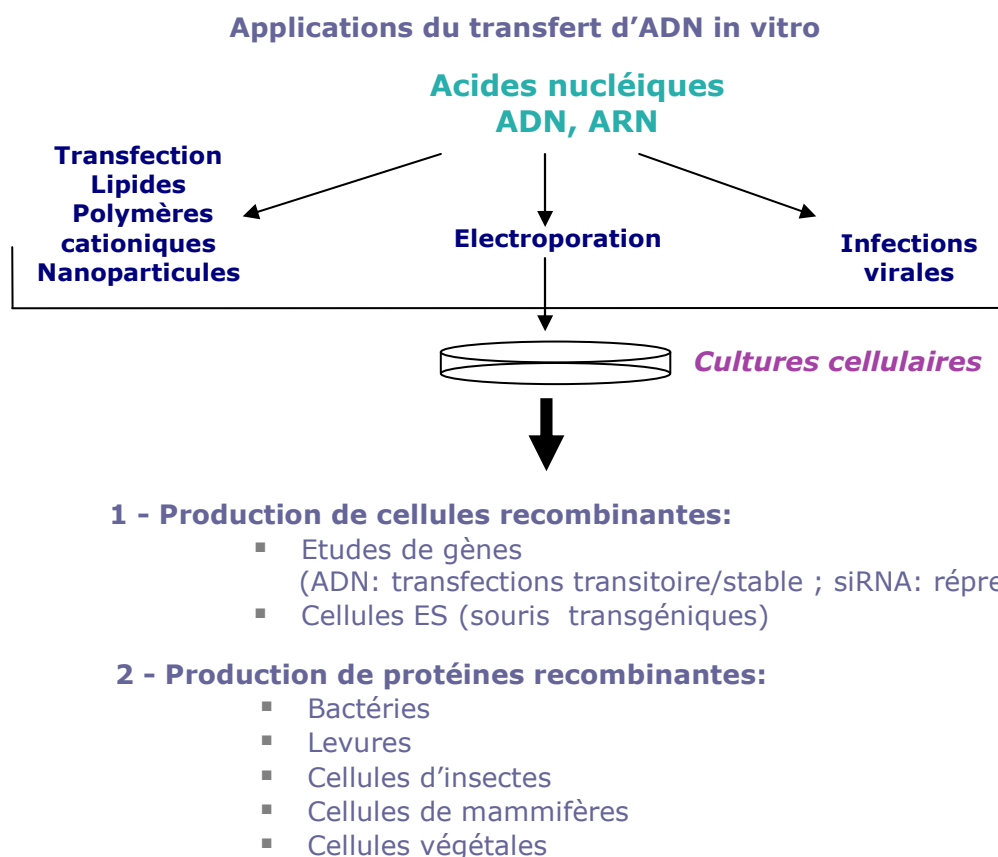


Figure 127. Applications du transfert d'ADN in vitro.

Les **lignées cellulaires d'hépatomes** et les **hépatocytes** en culture primaire ont fait l'objet de nombreuses transfections, dans le but d'étudier les mécanismes moléculaires de la régulation des gènes hépatiques notamment en réponse à des xénobiotiques (Gardmo et al, 2005; Ourlin et al, 1997) ou encore le routage intracellulaire des complexes (Goncalves et al, 2004).

III. Applications du transfert de gènes in vivo

L'application médicale du transfert de gènes in vivo porte le nom de **thérapie génique**, qui consiste à corriger les défauts de fonctionnement de l'organisme dus aux altérations des gènes, ces fragments du patrimoine génétique qui gouvernent la synthèse des protéines. Actuellement, dans tous les protocoles cliniques, le terme thérapie génique est employé pour désigner la **thérapie génique somatique** proprement dite (opération conduisant à l'addition ou l'extinction d'un gène dans des cellules non germinales d'un organisme) car, du point de vue éthique, il n'est pas encore admis d'appliquer la **thérapie génique germinale** à l'Homme. Par ailleurs, pour que le terme thérapie génique soit utilisé à bon escient, le transfert de gènes doit nécessairement avoir une visée curative.

La thérapie génique est un processus à visée thérapeutique curative, mis en application par les techniques du génie génétique. La thérapie génique a une plus grande portée sémantique que le **transfert de gènes**.

Dans l'usage, on a tendance à assimiler la thérapie génique au transfert de gènes proprement dit (transfert de gènes thérapeutique = thérapie génique).

1. Thérapie génique

La thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique dans des cellules humaines, pour pallier la cause des maladies d'origine génétiques héréditaires, notamment les maladies monogéniques (exemples : myopathie de Duchenne, mucoviscidose,...) (Cavazzana-Calvo & Fischer, 2007) ou acquises, comme le cancer (Vaha-Koskela et al, 2007). Dans le cadre du cancer, la thérapie génique a pour objectifs de **stimuler l'immunité anti-tumorale** par les cytokines et/ou d'exercer une action anti-cancéreuse notamment par le transfert d'un **gène suicide** (TK)/ganciclovir (Ogris & Wagner, 2002; Warren et al, 2002) ou cytosine déaminase/5-fluorocytosine.

<u>Maladie</u>	<u>Gène</u>
Immunodéficience sévère	ADA
Hémophilie A	Facteur VIII
Hémophilie B	Facteur IX
Anémie falciforme	β -globuline
Thalassémie	β -globuline
Maladie de Gaucher	Glucocérébrosidase
Mucoviscidose	CFTR
Maladie de Duchenne	Dystrophine
Hypercholestérolémie familiale	Récepteur des LDL

Figure 128. Maladies monogéniques candidates à la thérapie génique.

Pour qu'une maladie génétique soit candidate à une thérapie génique, il faut :

- Une certaine connaissance de la maladie (gène connu et cloné)
- Une mutation sur un faible nombre de gènes (un seul préférentiellement)
- Une absence d'autre thérapeutique efficace

Contrairement aux médicaments qui agissent sur l'activité et le fonctionnement d'une protéine, les gènes thérapeutiques interviennent davantage en amont, à la source même du dysfonctionnement, pour **traiter la cause** et non plus les symptômes.

Le premier essai clinique sur l'Homme a été réalisé en 1989 par l'équipe de Rosenberg (Rosenberg et al, 1990), pour traiter des patients atteints d'un mélanome avancé. Depuis, des centaines d'essais ont été menés dans le monde entier et sur un grand nombre de pathologies. Ils ont mis en lumière les difficultés techniques, théoriques et éthiques de cette approche, sans toutefois contredire les espoirs placés dans cette voie thérapeutique (Thèse Leblond, 2005).

Les dix ans d'essais thérapeutiques de thérapie génique ont apporté la preuve du principe de l'efficacité d'une thérapie génique (Cavazzana-Calvo et al, 2010). Le plus grand succès concerne les maladies héréditaires du système immunitaire pour lesquelles cette thérapie constitue une approche thérapeutique à la fois puissante en terme d'efficacité et de stabilité au cours du temps (Aiuti et al, 2009; Hacein-Bey-Abina et al, 2002). En effet, dix ans se sont écoulés depuis que le premier patient atteint de déficit immunitaire combiné sévère (DICS) lié au chromosome X (DICS-X1) a reconstitué de façon stable le compartiment lymphocytaire T qui lui faisait défaut.

Les essais thérapeutiques se sont étendus à d'autres **maladies héréditaires du système hématopoïétique** (déficit en adénosine déaminase ou ADA, granulomatose septique chronique (Ott et al, 2006), β -thalassémie (Leboulch, 2009), syndrome de Wiskott-Aldrich (Boztug, 2009), de la **peau** (épidermolyse bulleuse) (Mavilio et al, 2006), de **l'œil** (rétinite pigmentaire) (Simonelli et al, 2010), du **système nerveux central** (adrénoleucodystrophie [ALD] liée à l'X) (Cartier et al, 2009), dont les résultats sont dans l'ensemble très positifs, comme l'indique le tableau (Cavazzana-Calvo et al, 2010).

Maladie (Nombre de malades inclus)	Cellules génétiquement corrigées	Efficacité	Toxicité (références)
DICS-X1 (n = 20)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : 10 ans	Oui : mutagenèse insertionnelle [1, 10, 12, 13]
ADA (n = 18)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : 7 ans	Non [2, 9]
Anémie de Fanconi (n = 2)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Non	Non [14]
CGD (n = 4)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : transitoire	Oui : mutagenèse insertionnelle [3]
ALD (n = 3)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : 3 ans	Non [8]
WAS (n = 2)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : 4 ans	Non [5]
Hémoglobinopathies (n = 2)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Oui : 3 ans	Non [4]
VIH (n = 74)	CSH <i>ex vivo</i> (CD34 ⁺)	Difficile à évaluer	Non [15]
Reconstitution immunitaire après greffe de CSH (n = 85)	Lymphocytes T <i>ex vivo</i>	Oui	Non [16]
Épidermolyse bulleuse (n = 1)	Kératinocytes <i>ex vivo</i>	Oui : 4 ans	Non [6]
Rétinopathies congénitales (n = 15)	Rétine <i>in vivo</i>	Oui : 2 ans	Non [7]

Figure 129. Protocoles de thérapie génique.

ADA : adénosine désaminase ; ALD : adrénoleucodystrophie ; CGD : granulomatose septique chronique ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; DICS-X1 : déficits immunitaires combinés sévères lié à l'X ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; WAS : syndrome de Wiskott-Aldrich.
(Cavazzana-Calvo et al, 2010)

a. Les essais cliniques

Cette technologie qui traite la cause de la pathologie est très prometteuse, parce qu'elle souhaite proposer une solution alternative aux traitements conventionnels. Cet engouement explique le nombre élevé d'essais cliniques en cours de réalisation. Sur les 1577 essais cliniques, **1019 essais** soit **64,5% des essais cliniques** de thérapie génique dans le monde en 2009 portent sur le **cancer** (figure 130).

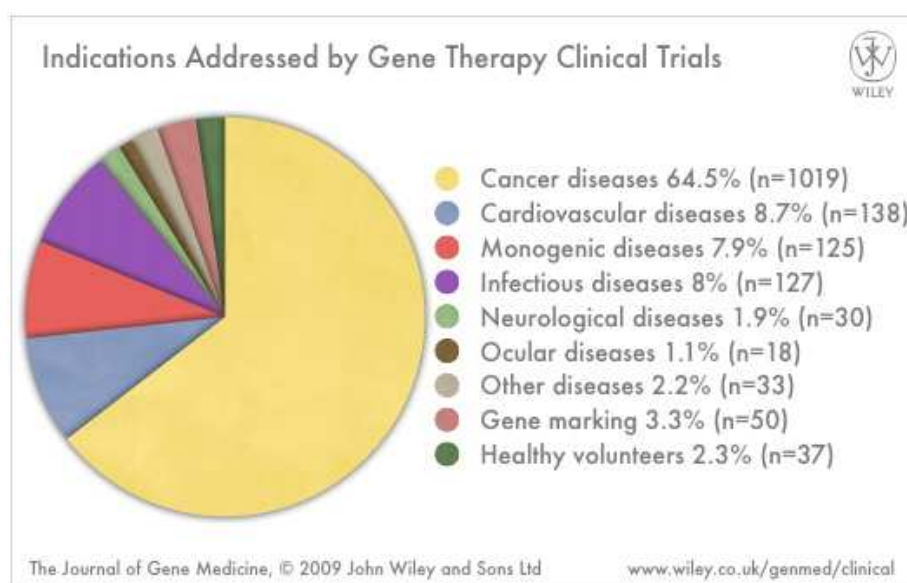


Figure 130. Indications des essais cliniques de thérapie génique en 2009.
D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

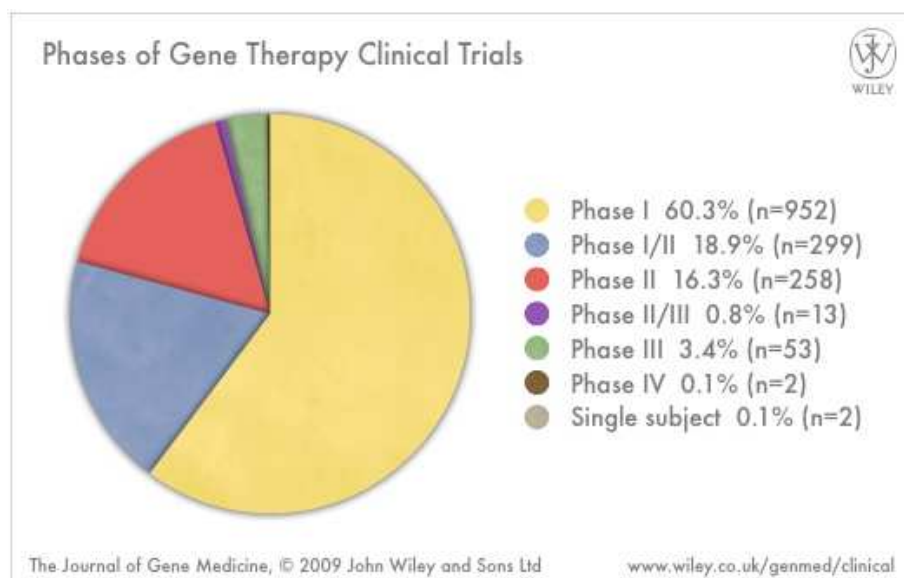


Figure 131. Phases des essais cliniques de thérapie génique en 2009.

D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

La prudence reste de mise, car la majorité des essais est en phase I (60,3%)(figure 131). Le faible pourcentage d'essais en phase III (3,4%) et en phase IV (0,1%) démontre les obstacles auxquels les essais thérapeutiques se heurtent mais aussi le manque de recul. En effet, les premiers essais cliniques ne datent que d'une vingtaine d'années (figure 132).

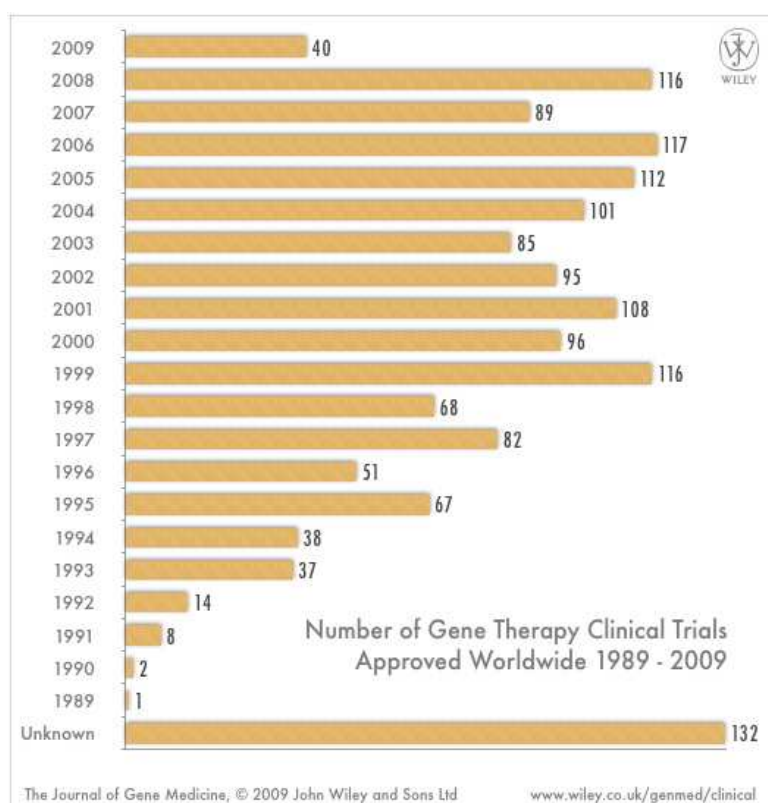


Figure 132. Nombre d'essais cliniques de thérapie génique approuvés dans le monde (1989-2009).

D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

La thérapie génique est fondée sur trois critères dictés par le choix du gène, le choix du vecteur et le choix de la stratégie (Ferry, 2003). En effet, la vectorisation doit s'adapter à

chaque situation et se définit clairement comme une thérapie personnalisée pour chaque indication.

b. Le choix de la stratégie : ex vivo ou in vivo

Deux stratégies existent en thérapie génique (figure 133):

- **Ex vivo** : Cette stratégie est basée sur le prélèvement de cellules, de les maintenir en culture pour les vectoriser avant de les réimplanter dans l'organisme. Elle présente l'avantage de cibler un type cellulaire souhaité et de contrôler le nombre de cellules traitées, sans dissémination des gènes et des vecteurs. En revanche, elle n'est applicable qu'aux tissus cultivables, comme les cellules de la moelle osseuse.
- **In vivo** : Cette technique consiste à injecter directement les vecteurs dans l'organisme. Différentes injections sont possibles (intramusculaire, intraveineuse, intra-péritonéale, ou par aérosol...) sans culture préalable. Toutefois, cette technique ne permet pas de cibler uniquement un seul type cellulaire avec certitudes ni de connaître l'efficacité de la vectorisation. Elle est applicable aux cellules non cultivables ex vivo comme les neurones.

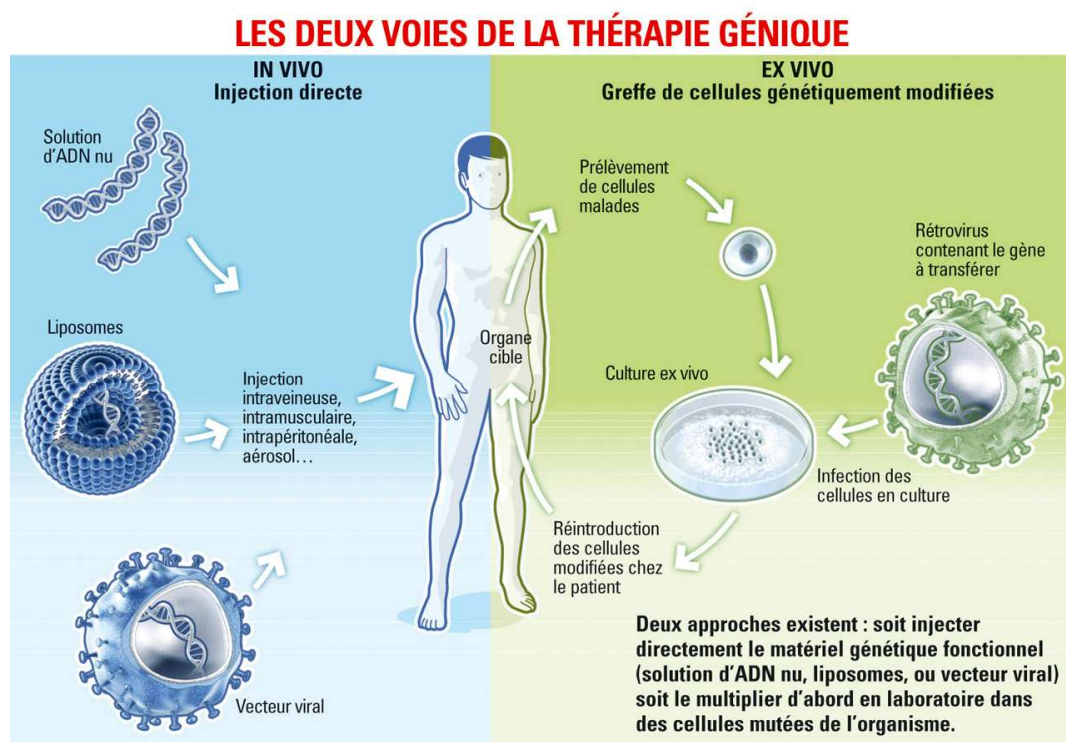


Figure 133. Les deux voies de la thérapie génique, in vivo et ex vivo.

D'après le site du CNRS <http://www2.cnrs.fr/presse/journal/3131.htm>

c. Le choix du gène

Les essais cliniques en cours de réalisation en 2009 ont utilisé un nombre varié de gènes (figure 134). Le cancer étant la pathologie la plus fréquente, les trois classes de gènes les plus représentés sont des antigènes (19,9%), des cytokines (18,3%), des gènes suppresseurs de tumeurs (10,8%).

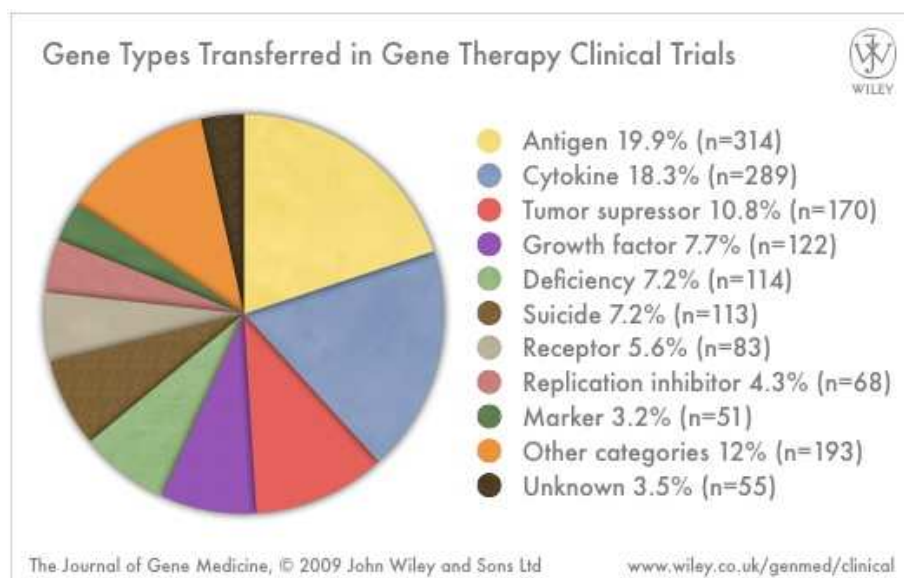


Figure 134. Classes de gènes transférés dans les essais cliniques de thérapie génique.
D'après <http://www.wiley.co.uk/genethrapy/clinical/>

d. Le choix du vecteur

La majorité des vecteurs utilisés dans les essais sont des virus de type adénovirus et rétrovirus (figure 135), en raison de leur efficacité notable de transfection. L'utilisation de l'ADN nu reste plus courante que celle de la lipofection.

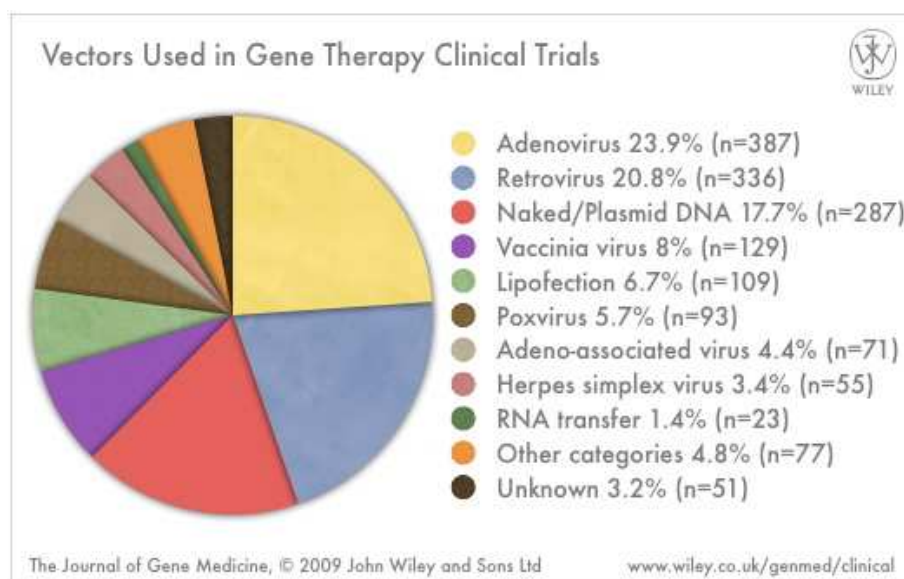


Figure 135. Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique.
D'après : <http://www.wiley.co.uk/genethrapy/clinical/>

2. Thérapie génique du cancer

Les progrès en matière de diagnostic et de thérapie ont permis la détection précoce des cancers, la classification des tumeurs (analyses de biopsies ou l'imagerie médicale) et le développement d'un arsenal thérapeutique, aboutissant à la **guérison d'un cancer sur deux**.

Au regard de ces constats, il était intéressant de développer des alternatives thérapeutiques en s'appuyant sur les technologies de la **vectorisation**.

Les progrès de la thérapie du cancer depuis la théorie de **Paul Ehrlich** (1897) ont été considérables, ils sont représentés en annexe 14. Plus de 100 ans après, son concept de « **Magic Bullet** » prend désormais tout son sens.

La thérapie génique est le transfert, vers une population cellulaire sélectionnée, d'un gène codant une protéine thérapeutique. Dans le cas d'une thérapie anti-cancéreuse, cette manipulation génétique peut conduire à stimuler le système immunitaire par des cytokines contre les cellules tumorales, exprimer des molécules « anti-cancéreuses » ou à transduire directement dans la tumeur un gène « suicide ».

Le but recherché, dans tous les cas, est la destruction sélective des cellules malignes, sans provoquer de cytotoxicité dans le tissu normal adjacent.

a. Essais cliniques de thérapie génique du cancer

Les essais cliniques en cours de réalisation sur le cancer sont résumés dans un tableau en annexe 6, il présente les essais sur les métastases du foie, le cancer métastatique, le cancer en général et le cancer digestif, les carcinomes, dont ceux qui expriment l'antigène CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) et les tumeurs.

b. Le choix du gène en thérapie génique du cancer

Parce que le cancer est une **maladie de l'ADN**, l'idée est de corriger le déficit acquis lors d'un cancer en introduisant un gène manquant ou inactif. Il peut s'agir d'un ou de plusieurs gènes pro-apoptotiques, suppresseurs de tumeur de type p53, suicides, des gènes du cycle cellulaire, des cytokines dans le cadre d'une immunothérapie, des gènes d'intérêt propres à une pathologie comme le cancer couplés ou non au gène d'un ligand.

La stratégie de transfert d'un gène suppresseur de tumeur est d'autant plus efficace lorsque la physiopathologie du cancer est associée au dérèglement d'un ou de plusieurs gènes identifiés. Cette démarche met en exergue l'importance de la **carte d'identité des tumeurs**. Cette dernière indique les gènes qui s'expriment différemment dans les cellules tumorales et dans les cellules normales pour chaque tumeur, ces gènes sont autant de cibles potentielles pour en surexprimer ou inhiber l'expression. A chaque type de tumeur correspond un traitement personnalisé.

Le tableau ci-après (figure 136) précise le nom des gènes transfectés, il a été établi en détaillant chacun des essais cliniques sur le cancer, d'après : <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>.

Classes et noms des gènes utilisés seuls ou associés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009	
Suicide	HSV-TK : Herpes simplex virus thymidine kinase ADV-TK : Adenovirus thymidine kinase Rat prodrug enzyme CYP2B1
Tumor suppressor	p53 Nitroreductase NV1020 E1B deleted
Cytokine	IL-2, IL-12 Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) Interferon-beta (IFN-beta) Tumor Necrosis Factor (TNF)
Receptor	Fas-TNF Receptor Chimera Transgene B7.1 (CD80)
Antigen	Oncofoetal antigen 5T4 Carcinoembryonic antigen (CEA) CAP-1 peptide from CEA MUC-1 MAGE-1, MAGE-3 Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) HLA-B7/Beta 2-Microglobulin PRAME and PSMA Alpha-Fetoprotein
Antisense	Antisense DNA to human X-linked inhibitor of apoptosis Transforming growth factor-2 (TGF-2) antisense
Adhesion molecule	Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) LFA-3
Marker	Humanized Escherichia coli - galactosidase CD3
Growth Factor	IGF-1

Figure 136. Classes et noms des gènes utilisés seuls ou associés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009. D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Cependant, il faut rappeler que les essais cliniques n'auraient pas pu voir le jour sans les nombreux travaux sur la carcinogenèse.

Hahn et Weinberg avaient répertorié toutes les pistes potentielles de thérapie anti-tumorale en incluant les pistes encore balbutiantes en 2002.

Leur publication a marqué un tournant dans la thérapie contre le cancer.

Hahn et Weinberg ont rappelé que le cancer survient suite à une accumulation de changements génétiques qui confèrent à une cellule néoplastique naissante les propriétés de croissance illimitée et auto-suffisante ainsi que la résistance aux mécanismes normaux de régulation de l'homéostasie. Ces avancées en génétique humaine et en biologie cellulaire et moléculaire ont permis d'appréhender les voies et leurs interconnexions et par conséquent le développement des thérapies moléculaires ciblées et personnalisées qui changeront à terme la pratique de l'oncologie. La carte de métro (figure 137) a eu pour ambition d'identifier les différentes voies de thérapie du cancer. En dépit de son année de publication (2002), cette représentation originale reste toujours d'actualité dans la démarche thérapeutique.

Les avancées ont permis d'identifier les phénotypes cellulaires (représentées sur la figure par les destinations principales de la carte de métro) qui sont responsables de la transformation maligne. Les voies moléculaires spécifiques qui programment ces comportements sont représentées par les lignes de métro. Bien qu'il reste quelques inconnues (lignes en construction), les grandes lignes permettant de court-circuiter le cancer sont désormais dessinées.

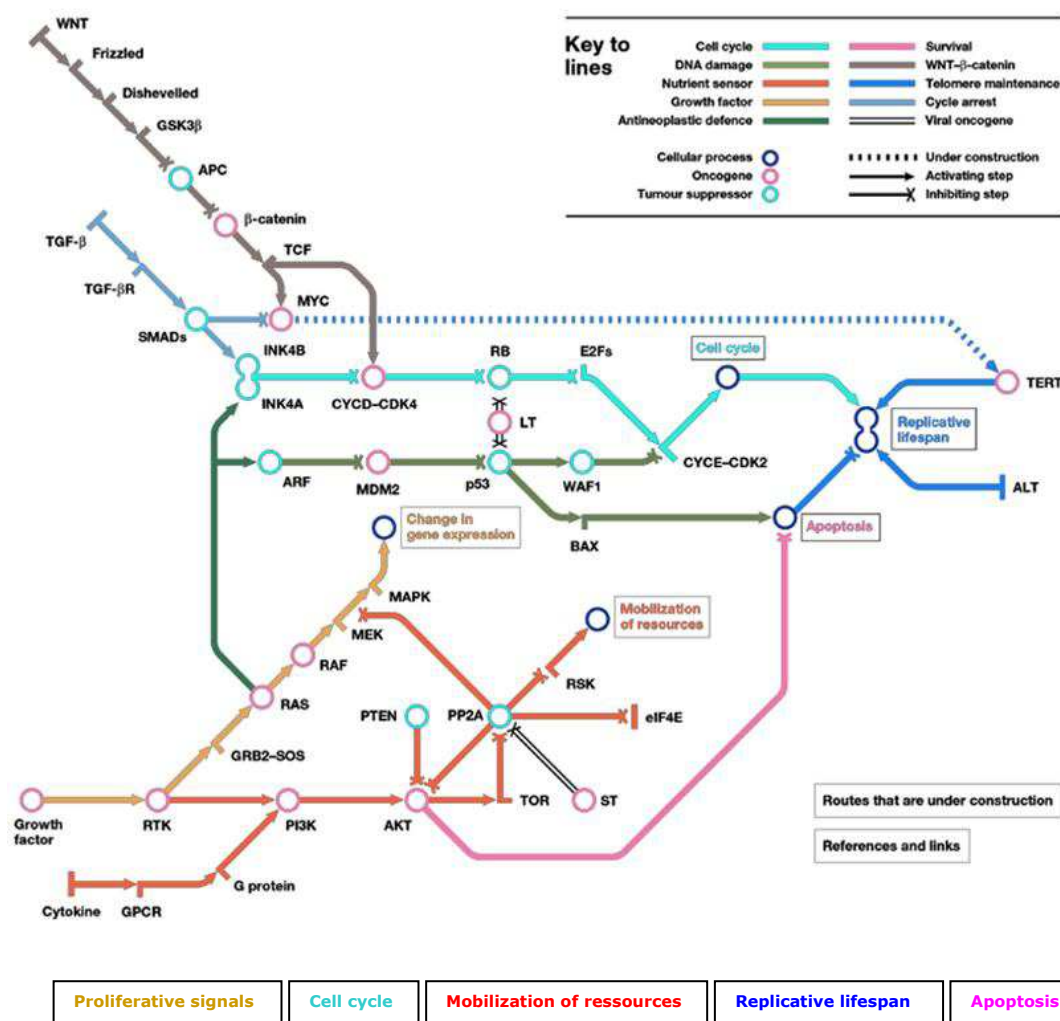


Figure 137. Pistes de thérapie génique en oncologie.

Cette carte a pour ambition d'identifier les différentes voies de thérapie sous la forme d'une carte de métro.

D'après Hahn et Weinberg. A subway map of cancer pathways. Nature Reviews Cancer.

<http://www.nature.com/nrc/posters/subpathways/index.html>

▪ Apoptose

Le but est d'activer l'apoptose dans les cellules cancéreuses, cette première voie est basée entre autres sur des **corrections des anomalies génétiques** :

- Par l'inhibition ciblée de l'expression d'un oncogène : ADN antisens (c-myc - lymphome) (McManaway et al, 1990) ARN antisens (k-ras - CPNPC) (Mukhopadhyay et al, 1991)
- Par ré-expression de gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, BRCA1
- En activant la voie du suppresseur de tumeur p53 et des protéines pro-apoptotiques comme BAX. L'**apoptotine** est en cours d'évaluation, une protéine pro-apoptotique d'un virus aviaire, spécifique des cellules tumorales.
- En inactivant les voies anti-apoptotiques telles la voie du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

L'inactivation de **gènes suppresseurs de tumeurs** est très fréquemment retrouvée dans de nombreux cancers (figure 138). L'exemple le plus connu et le plus étudié est le **p53** (gène impliqué dans le cycle cellulaire). Ce gène est très souvent retrouvé muté dans les cancers, en particulier, dans les **carcinomes hépatocellulaires** induits par

l'aflatoxine et par le virus de l'hépatite B. Une surexpression de p53 entraîne une induction de l'apoptose et inhibe la croissance tumorale dans des lignées cellulaires tumorales pouvant ainsi devenir une solution thérapeutique chez des patients atteints de CHC.

Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

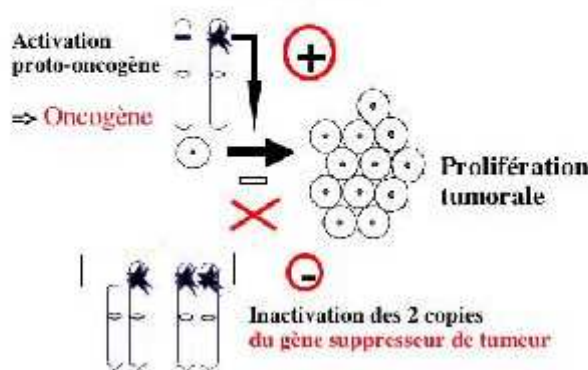


Figure 138. Transfert d'un gène suppresseur de tumeur. La physiopathologie du cancer peut être associée au dérèglement d'un ou de plusieurs gènes, ici l'activation d'un proto-oncogène en oncogène et l'inactivation des deux copies du gène suppresseur de tumeur.

Laurent-Puig, Module de cancérologie DCEM3, Faculté de Médecine Necker Enfants Malades, 2003/2004.

▪ Potentiel illimité de répllication

L'immortalisation est l'un des marqueurs du cancer en raison du maintien des télomères dans les cellules cancéreuses, contrairement aux cellules normales où les télomères sont dégradés sous l'effet de la télomérase. Les cellules cancéreuses possèdent au moins deux des trois mécanismes suivants permettant la conservation des télomères sur lesquels les thérapies peuvent se développer :

- Activation dans 85 à 90% des cellules cancéreuses de TERT, le composant protéique de la télomérase
- Voie ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) dans 10 à 15% des cas, en absence de télomérase active.
- Inactivation de la télomérase par l'expression d'ARN « template » mutés

▪ Signaux de prolifération

Les signaux extracellulaires jouent des rôles importants dans la régulation de l'homéostasie de la croissance et de la prolifération cellulaires. Beaucoup de voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance contribuent donc à l'invasion et à la formation de métastases des cellules cancéreuses. Les cibles peuvent concerner les récepteurs des tyrosines kinases (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), qui sont activés par les facteurs de croissance qui impliquent deux grandes voies, RAS et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

▪ Cycle cellulaire

Deux voies suppressives de tumeur qui bloquent la progression dans le cycle cellulaire sont inactivées dans la plupart des cellules cancéreuses, celles du rétinoblastome (Rb) et de p53.

▪ Mobilisation des ressources

Dans les cellules cancéreuses, l'expression de gènes inappropriés et l'activation de programmes métaboliques confèrent des avantages spécifiques permettant aux cellules de se diviser constamment. Les altérations affectent :

- la biosynthèse des ribosomes
- l'expression d'antigènes associés à la différenciation
- les enzymes impliquées dans le métabolisme nutritionnel
- les enzymes qui régulent le potentiel oxydatif

▪ Stratégies anti-angiogéniques

Les cellules endothéliales doivent être recrutées, croître, se diviser et envahir la tumeur pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. La stratégie est basée sur

- l'inhibition ciblée de l'expression des facteurs pro-angiogéniques : ARN antisens (VEGF ou récepteur)
- l'expression de gènes anti-angiogéniques : endostatine ou angiostatine

Depuis, des traitements anti-angiogéniques ont vu le jour comme le Sorafénib utilisé dans le traitement du carcinome hépato-cellulaire.

▪ Métastases

La formation des métastases se définit par le détachement d'une cellule cancéreuse de la masse tumorale pour gagner la matrice extracellulaire, puis un vaisseau sanguin ou lymphatique et enfin repeupler et survivre dans un tissu à distance. Ce mécanisme repose en partie sur le TGF- β , l'hépatocyte growth factor (HGF) et la perte des molécules d'adhésion (E-cadhérine).

▪ Interactions tumeur/stroma

Les cellules tumorales peuvent remodeler leur environnement (production des métalloprotéinases matricielles) qui modifient la matrice extracellulaire ou en attirant des cellules immunes.

▪ Voies tissu-spécifiques

Les différents tissus ont leurs propres circuits de régulation, la dérégulation de l'un d'entre eux peut contribuer à l'initiation ou la progression tumorale, comme la voie WNT β -caténine dans le cancer colorectal.

▪ Régulation de la stabilité génomique

Les agents intercalants de l'ADN ou les radiations ioniques sont deux exemples de facteurs impliqués dans l'instabilité génomique.

▪ Immunothérapie

L'infection et l'inflammation jouent des rôles importants dans le développement de fortes réponses immunitaires qui accompagnent la progression tumorale, d'où l'importance de stimuler le système immunitaire. Auparavant appelée surveillance immunitaire, cette voie thérapeutique est aujourd'hui connue sous le nom d'**immunothérapie** (Catros-

Quemener et al, 2003; Leclercq, 1999). Elle se décline autour de trois axes que sont la **stimulation de la réponse immunitaire** par l'administration d'interleukines, INF- γ et TNF- α , la **transfection des cellules dendritiques** (Enomoto et al, 2000), des lymphocytes T et des fibroblastes autologues et enfin de la **vaccination thérapeutique** par des antigènes spécifiques de la tumeur comme Mela-7 (melanoma differentiation - associated gene - BAX +).

▪ Gènes suicides (addition de gènes)

Cette stratégie consiste à injecter dans une tumeur un vecteur codant une protéine capable de provoquer une toxicité pour les cellules cibles, par l'expression de gènes de sensibilité conditionnelle. L'exemple type est l'utilisation de l'HSV1-TK (Herpes simplex virus 1 - thymidine kinase) couplé à l'administration du ganciclovir (HSV1) (GCV) (Boyer, 1999; Faulds & Heel, 1990; Ogris & Wagner, 2002). Le ganciclovir est administré à des cellules transfectées par l'HSV-TK et donc exprimant la kinase. Le ganciclovir phosphorylé par la kinase est alors capable d'inhiber la synthèse d'ADN (figures 139 et 140). Cette stratégie a été utilisée dans le traitement du cancer primitif du foie chez le rat traité au DEN (modèle de rat développant des tumeurs hépatiques). Dans ce modèle, une réduction massive de la taille des tumeurs a été montrée. L'action anti-cancéreuse peut également s'exercer par le transfert d'un autre système de gène suicide appelé cytosine déaminase/5-fluorocytosine (5FC \rightarrow 5FU) (Consalvo et al, 1995).

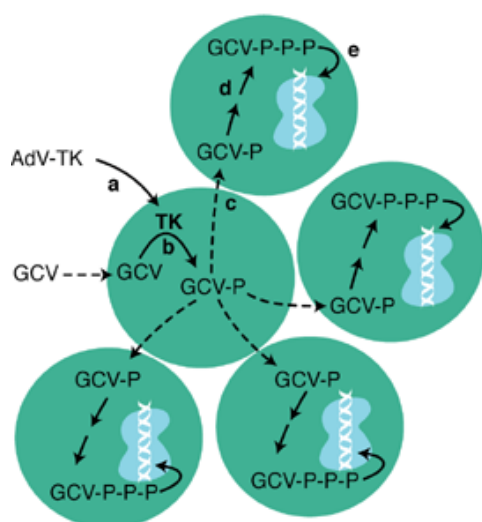


Figure 139. Thérapie par gènes suicides. (a) Un vecteur adénoviral (AdV) délivre le gène thymidine kinase (TK) du virus herpes simplex à la cellule tumorale cible. (b) L'enzyme TK exprimée phosphoryle la drogue antivirale ganciclovir (GCV), en nucléotide (GCV-P), une réaction biochimique que les kinases des mammifères ne peuvent terminer. (c) GCV-P peut être transporté vers les cellules adjacentes à travers les jonctions gap (d) où les kinases des mammifères peuvent ajouter deux phosphates supplémentaires produisant le trinucleotide (GCV-P-P-P). (e) GCV-P-P-P peut être incorporé dans l'ADN ; cependant, les ADN polymérases ne peuvent pas répliquer l'ADN contenant GCV-P-P-P. La mitose est interrompue et la cellule meurt. Parce que le GCV-P peut être transporté dans les cellules adjacentes, toutes les cellules n'ont pas besoin d'être transduites par le vecteur viral afin d'être tuées, d'où le nom de **toxicité de voisinage ou effet bystander**. D'après Hurwitz, Chévez-Barrios, Boniuk, Chintagumpala Hurwitz. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003. <http://www.expertreviews.org/>

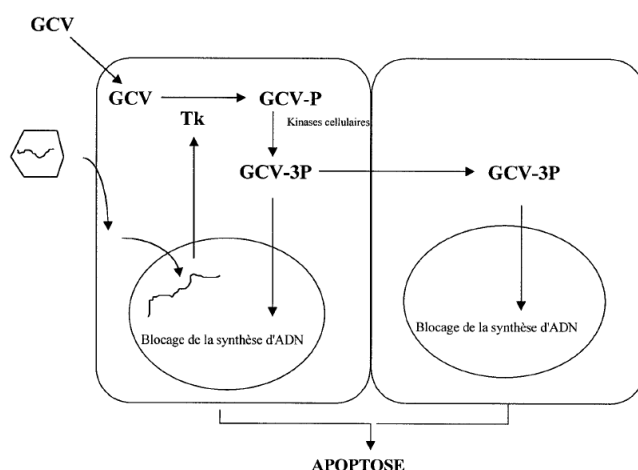


Figure 140. Représentation schématique du transfert du gène suicide codant pour la thymidine kinase herpétique (Tk) par un vecteur adénoviral, associé à un traitement par ganciclovir (GCV). L'adénovirus recombinant (AdTk) pénètre dans la cellule cible. L'ADN viral, qui contient le gène Tk, est transloqué dans le noyau de la cellule cible où il reste en position extrachromosomique. La cellule cible produit alors de la Tk qui va effectuer la première phosphorylation du GCV. Le GCV monophosphorylé est di-, puis triphosphorylé par les kinases cellulaires. Le GCV-3P est incorporé dans la synthèse d'ADN où il bloque l'ADN polymérase induisant l'apoptose des cellules en cours de division. Le GCV-3P peut également passer de cellule à cellule par les jonctions de type Gap et induire l'apoptose des cellules adjacentes à la cellule exprimant la Tk (effet bystander) (Gerolami et al, 2001).

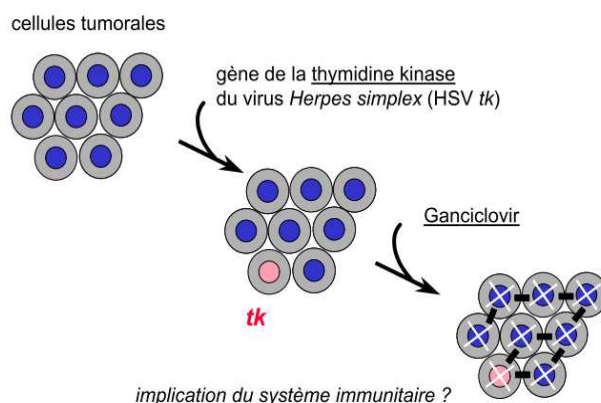


Figure 141. Gène suicide et effets de voisinage/bystander

D'après Montier, Développement de vecteurs pour le transfert de bio-molécules : applications au domaine de la cancérologie. Conférences Master 2 – Cancéropole Grand Ouest, 2010.

En raison de l'importance de l'effet bystander (figure 141), un effort est porté sur les **connexines**, les protéines transmembranaires des jonctions Gap junctions par lesquels l'effet "suppresseur" s'exerce.

▪ Virothérapie

Cette voie est basée sur l'utilisation de virus lytiques capables de se multiplier uniquement dans les cellules tumorales :

- ONYX-015 délété E1B (Ad delE1B) pour cellules p53 négatives
- Combinaison avec cisplatine/5FU (essai phase III)

c. Choix du vecteur en thérapie génique du cancer

Ce tableau (figure 142) dresse la liste des vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009.

<i>Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009</i>
Virus
<i>Adenovirus</i>
<i>Poxivirus</i>
<i>Herpes Simplex virus</i>
<i>Retrovirus</i>
<i>Vaccinia virus</i>
<i>Vesicular stomatitis virus (Oncolytic virus)</i>
Naked/ Plasmid DNA + Adenovirus
Naked/ Plasmid DNA
Lipofection
Saccharomyces cerevisiae

Figure 142. Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique contre le cancer en 2009.

D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

d. Applications des vecteurs synthétiques au cancer

Le concept de thérapie génique tumorale in vivo repose à ce jour sur ce schéma (figure 143):

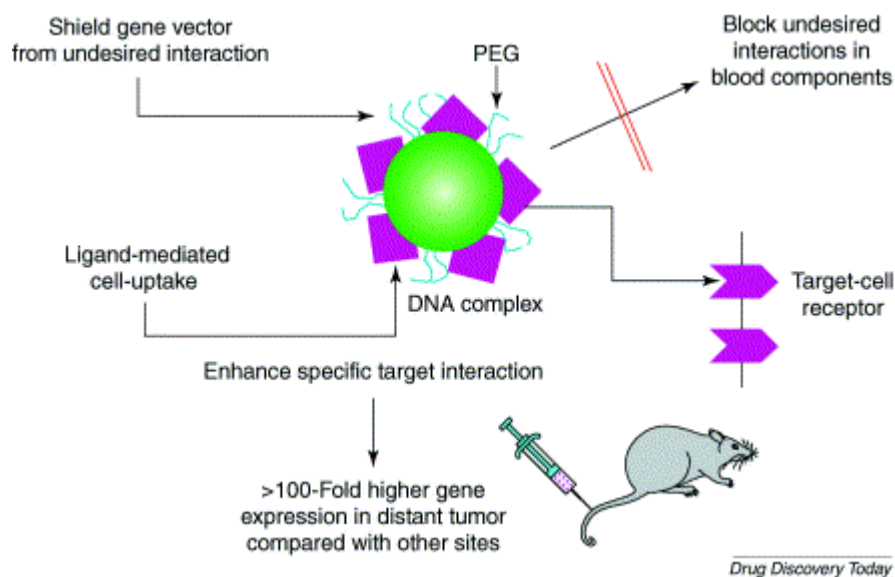


Figure 143. Complexe vecteur/ADN portant des éléments de furtivité (PEG) et des ligands ciblant les récepteurs cibles des cellules à transférer.

Plusieurs applications utilisant des vecteurs synthétiques sont illustrées ci-après :

- **Immunisation et thérapie anti-mélanome avec des lipopolyplexes riches en histidine contenant l'ARN messager de l'antigène tumoral MART1** (figure 144)

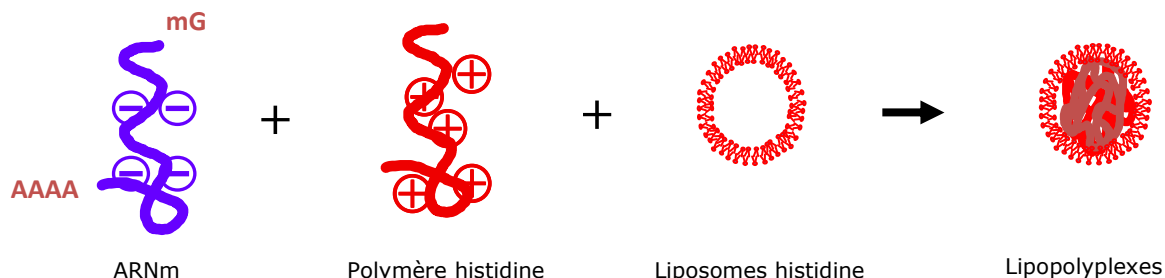


Figure 144. Exemple d'immunothérapie par lipopolyplexes.

Cette étude démontre que les lipopolyplexes histidinés vectorisant l'ARNm MART1 apportent une efficacité antitumorale et induisent une réponse immunitaire (Mockey et al, 2007).

- **Utilisation des lipophosphoramidates monocationiques pour le transfert de gènes** (figure 145)

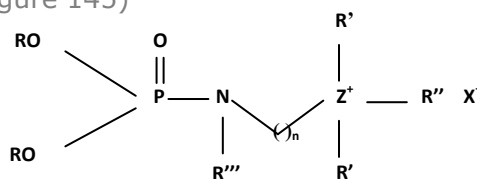


Figure 145. Lipophosphoramidate monocationique.

Cette classe de lipides a démontré son efficacité et son innocuité dans de nombreuses publications (Lamarche et al, 2007; Le Gallo et al, 2008; Mevel et al, 2007; Montier et al,

2004a; Montier et al, 2004b; Picquet et al, 2005), c'est pourquoi elle est protégée par le Brevet International : PCT n° FR03/50116 - 07/11/2003.

La dernière publication de Le Gall étudie le lipide BSV4. Si son efficacité est modeste in vitro, elle est bien meilleure in vivo, notamment dans le poumon chez la souris (Le Gall et al, 2010).

▪ **Chargement de cellules dendritiques au moyen de lipides cationiques**

Les cellules dendritiques ont été transfectées par le lipophosphoramide cationique KLN5 complexé à un plasmide codant l'antigène NY-ESO-1. Les cellules T spécifiques des tumeurs ont été activées par la présentation de cet antigène tumoral.

Ce chargement des cellules dendritiques représente une nouvelle approche non virale de la vaccination anti-cancer (Le Gallo et al, 2008).

▪ **Génération d'un modèle mélanome luminescent – Transfert de gènes suicides au moyen de vecteurs synthétiques**

Des souris sont traitées par transfection du gène suicide HSV-tk au moyen du lipide KLN47 puis soit par ganciclovir IP (50 mg/kg) 2/j pendant 12j soit par NaCl IP (1,8 ml) 2/j pendant 12j (équipe Montier).

▪ **Ciblage des récepteurs au folate pour une spécificité de la transfection** (Laine et al, 2008)

▪ **Obtention d'un vecteur d'acides nucléiques efficace par injection systémique :**

La surface des nanocapsules lipidiques (LNC) contenant de l'ADN est optimisée par l'utilisation de chaînes de PEG plus longues (figure 146) qui augmentent le temps de circulation sanguine, ce qui conduit à une accumulation tumorale, sans causer de dommages hépatiques (Morille et al, 2010).

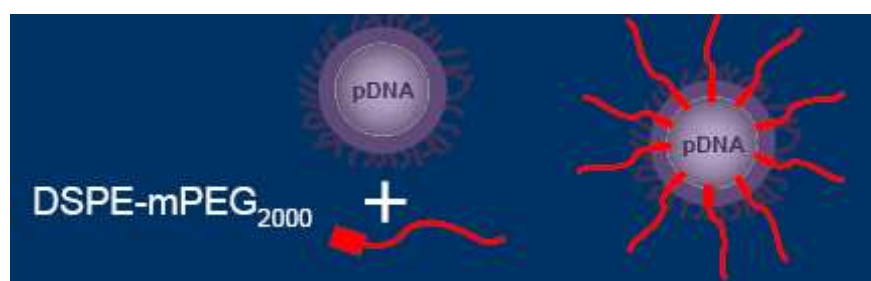


Figure 146. Nanocapsules lipidiques (LNC) stabilisées par de longues chaînes de PEG (Morille et al, 2010).

3. Thérapie génique du Carcinome Hépatocellulaire

Certaines formes du cancer restent difficiles à traiter comme le **carcinome hépatocellulaire**. Les traitements actuels, détaillés précédemment, reposent sur l'ablation chirurgicale (selon la localisation et la taille de la tumeur), la greffe de foie, la chimio-embolisation, l'immunothérapie et la chimiothérapie.

Les échecs thérapeutiques s'expliquent par une absence de réponse aux traitements chimiothérapiques, par la présence de tumeurs non opérables et de récives rapides.

Le CHC fait l'objet d'un grand nombre d'essais cliniques résumés dans le tableau (figure 147).

Hepatocellular Carcinoma (HCC) – Liver Cancer						
<i>Indication</i>	<i>Gene(s)</i>	<i>Vector</i>	<i>Injection</i>	<i>Responsible</i>	<i>Pays</i>	<i>Phase</i>
Primary HCC or Metastatic Colorectal Carcinoma in the Liver	No transgene	Vesicular stomatitis virus (Oncolytic virus)	Intrahepatic artery	M. W. Sung	USA	I
HCC	No transgene	Vesicular stomatitis virus	Intratumoral	M.J. Borad	USA	I
	GM-CSF Humanized Escherichia coli - galactosidase		Intratumoral	T.Reid	USA	II
	Alpha-Fetoprotein GM-CSF	Naked/Plasmid DNA + Adenovirus	Intradermal	L.H. Butterfield	USA	I/II
	ADV-TK	Adenovirus		D.Ma	China	II
	ADV-TK	Adenovirus		Beijing Chao Yang Hospital	China	II
	E1B deleted	Adenovirus		N.A. Habib	UK	I
	p53	Adenovirus	Intratumoral	C. P. Belani	USA	I
Non operable HCC		Herpes simplex virus	Intraarterial		UK	I/II
	IL-12	Retrovirus	Intratumoral	CHU Toulouse	France	I
Liver cancer	IL-12	Adenovirus	Intratumoral	M.W. Sung	USA	I
	p53	Adenovirus		N.A. Habib	UK	I/II
	Nitroreductase	Adenovirus	Intratumoral	N.D. James	UK	I
Primary or Secondary Liver Cancer	Rat prodrug enzyme CYP2B1	Herpes simplex virus	Intrahepatic artery	K.K. Tanabe	USA	I
Post-hepatitis liver cancer	p53	Naked/Plasmid DNA	Intratumoral	N.A. Habib	UK	II
Liver (Hepatic) Malignancies	Alpha-Fetoprotein	Adenovirus	Intravenous	J.S. Economou	USA	I/II
Hepatoma, colon cancer	IGF-1 (Growth Factor)	Naked/Plasmid DNA	Subcutaneous	T.Popiela	Poland	I/II

Figure 147. Tableau des essais cliniques de thérapie génique du cancer du foie et du CHC.

D'après <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Le foie est un bon candidat pour la thérapie génique (Ferry, 2003; Ferry, 2009) car c'est un organe unique, facilement accessible ex vivo et in vivo, et composé d'un parenchyme homogène. D'autre part, son endothélium est fenestré ce qui permet l'extravasation de structures macromoléculaires comme les complexes de biomolécules vectorisées. Le foie sera l'organe atteint préférentiellement si l'injection est réalisée par voie parentérale.

La thérapie génique du cancer primitif du foie présente plusieurs contraintes d'accessibilité. En effet, les fenestrations endothéliales se referment lors des maladies chroniques hépatiques, de même, la membrane basale s'épaissit. C'est pourquoi, la voie d'administration est souvent intra-tumorale.

Plusieurs stratégies sont dessinées (Gerolami et al, 2003; Hernandez-Alcoceba et al, 2006; Hernandez-Alcoceba et al, 2007; Hwang, 2006; Nguyen & Ferry, 2004) :

- Restauration des gènes suppresseurs de tumeurs de type p53
- Inhibition des oncogènes comme Ras
- Gènes suicides
- Expression ciblée de gènes cytotoxiques ou pro-apoptotiques comme TRAIL
- Immunothérapie (Interleukines 2, 7, 12, 15, 18, 21, 23, 24)
- Antigène tumoral spécifique du CHC, l'alpha-foetoprotéine
- Thérapie anti-angiogénique bloquant le VEGF
- Virus oncolytiques : ONYX-015
- Stratégie anti-sens

Des ligands du CHC voient le jour, outre le **folate** surexprimé dans les cellules cancéreuses :

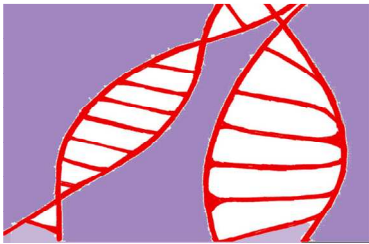
- Les **anticorps monoclonaux** (Rivest et al, 2007) comme l'anticorps monoclonal **AF-20** qui permet une transfection efficace, spécifique et rapide des immunoliposomes vers le CHC comparé à un anticorps monoclonal non spécifique du CHC humain (Moradpour et al, 1995).
- Des **peptides** : Séquence de *Plasmodium* de 19 acides aminés ciblant les hépatocytes in vivo (Longmuir et al, 2006).
- Des **lectines**.
- Des **sucres**, comme le galactose qui cible le récepteur asialoglycoprotéine (Cho et al, 2009; Fumoto et al, 2004; Peng et al, 2007; Sun et al, 2005; Wang et al, 2008).
- La **transferrine**
- L'**epidermal growth factor**
- Le greffage de **chondroïtine-sulfate** surexprimé par les cellules métastatiques a permis d'augmenter l'efficacité de la vectorisation in vivo de cisplatine encapsulée dans des liposomes cationiques (Lee et al, 2002).
- **Histidine et imidazole** (Midoux et al, 2009).
- **Ligand de l'uPAR** (urokinase) (Boucquey et al, 2005).
- **Ligand au récepteur de l'HGF, cMet** (Nguyen et al, 2003).
- **Protéine pre-s2** du virus de l'hépatite B (Ni et al, 2010; Schulze et al, 2007).

4. Conclusion sur la thérapie génique

La thérapie génique a suscité beaucoup d'espoir dès les années 80. Après une longue période de déception, qui n'a pas empêché les chercheurs de progresser, cette approche de l'ADN médicament redevient prometteuse. Les différents obstacles et limites du transfert de gènes sont désormais mieux compris. Par ailleurs, les techniques se sont améliorées afin de mieux connaître les complexes ADN/vecteur, oligonucléotide/vecteur ou principe actif/vecteur. Les gènes, les vecteurs, les modes d'administration ont évolué. Le challenge actuel du transfert de gènes est de mettre au point de **meilleurs vecteurs** par la découverte de nouveaux vecteurs plus efficaces et plus spécifiques et par la combinaison des vecteurs déjà développés (notamment de types différents).

En outre, le but est d'avoir recours à de **meilleurs modèles expérimentaux** pour une meilleure prédiction par rapport aux essais cliniques.

Enfin, le concept est de ne plus opposer mais d'**associer** plusieurs gènes et plusieurs stratégies comme la thérapie génique aux autres traitements conventionnels (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormothérapie, anticorps monoclonaux...).



CADRE ET BUTS DU TRAVAIL

*« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte. »
Louis Pasteur*

Un des thèmes de recherche de l'unité INSERM U991 est la compréhension des mécanismes contrôlant l'équilibre entre prolifération et différenciation dans les hépatocytes. Cette étude porte plus particulièrement sur l'identification des gènes impliqués dans la résistance des hépatocytes à l'apoptose et l'induction du cycle cellulaire au cours de la régénération du foie.

Dans le foie normal, les hépatocytes sont des cellules différenciées et quiescentes (phase G0), présentant de faibles taux de mort cellulaire et de prolifération. Cependant, le foie est soumis à divers stress tels que l'ischémie/reperfusion, résection partielle, choc septique, intoxications par les xénobiotiques qui peuvent être responsables de lésions et d'une perte tissulaire. Le foie répond à ces stress par la mise en place de mécanismes de défense visant à limiter la mort cellulaire et l'initiation d'un processus de régénération du foie, permettant de reconstituer la masse hépatique (Fausto, 2000). L'étude de ces deux réponses constitue le cadre général des travaux menés dans notre équipe «Stress, défenses et régénération» au sein de l'Unité 911. Les travaux antérieurs et actuels de l'équipe portent notamment sur l'étude du rôle de trois kinases dépendantes de cyclines (CDKs). Les CDKs sont des sérine/thréonine protéines kinases inactives sous forme monomérique et dont l'activation dépend de leur association avec une protéine de la famille des cyclines. A côté du rôle très largement décrit des complexes CDK/cyclines dans la régulation du cycle cellulaire, certains de ces complexes sont impliqués dans la régulation de la transcription, de l'épissage, et, plus largement, dans les processus de différenciation ou d'apoptose.

Les approches expérimentales utilisées dans le contexte de cette recherche allient des modèles *in vivo* chez le rat et la souris et des modèles *in vitro* de culture primaire d'hépatocytes humains et murins et des lignées d'hépatomes différenciées. De plus, pour la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent ces processus, il a été développé différents protocoles de transfection d'acides nucléiques dans le but d'interférer avec l'expression des gènes impliqués. En collaboration avec l'équipe de D. Plusquellec et T. Benveniste à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), il a été établi des conditions efficaces de transfection de culture primaire d'hépatocytes de rat et souris en utilisant des lipides cationiques à tête glycine bêtaïne (Gilot et al, 2002b). Ces protocoles ont été essentiels pour étudier divers mécanismes moléculaires participant aux voies de survie de l'hépatocyte notamment l'interaction fonctionnelle entre des glutathion transférases et la protéine kinase pro-apoptotique ASK1 (Gilot et al, 2002a). Plus récemment, notre équipe a également développé un protocole de transfection de siARN ciblant les hépatocytes de rat en culture primaire et qui a permis de démontrer l'implication de la kinase dépendante de cyclines CDK1 dans la phase S au cours du cycle de l'hépatocyte normal (Garnier et al, 2009).

La **lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain HepaRG**, isolée au laboratoire (Gripon et al, 2002), est constituée de cellules qui présentent un phénotype de progéniteurs bipotents hépatiques, en phase proliférative. A confluence, la prolifération cesse par inhibition de contact, et les cellules s'engagent à 50% dans la voie biliaire et à 50% dans la voie hépatocytaire (Cerec et al, 2007). Cette lignée est un **modèle de choix pour l'étude de la prolifération et de la différenciation hépatocytaire** car, à l'état différencié, les hépatocytes expriment la majorité des fonctions spécifiques du foie à un niveau proche de celui des hépatocytes normaux en culture primaire. Aborder les mécanismes qui sous-tendent la prolifération, la différenciation ou la régulation des voies métaboliques exprimées dans ces cellules nécessitait la mise au point de techniques de transfection efficaces de ces cellules HepaRG.

Ainsi, les objectifs des travaux de thèse ont été :

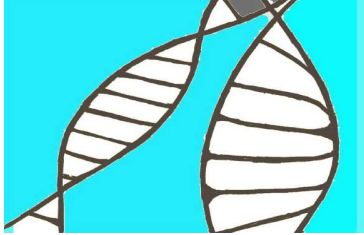
- 1 - De mettre au point une stratégie efficace de vectorisation d'acides nucléiques dans les cellules d'hépatome humain HepaRG différenciées ou progénitrices et caractériser les paramètres limitant l'efficacité de transfection. L'établissement de ces protocoles a permis d'obtenir la surexpression du cytochrome CYP2E1 et la répression par siARN de l'expression du récepteur AhR dans les cellules HepaRG différenciées.
- 2 - D'évaluer la possibilité de dériver des lignées recombinantes exprimant de façon stable un gène d'intérêt en utilisant les protocoles de transfection mis au point dans la première partie du projet. Une étude pilote a été réalisée en utilisant comme transgène un vecteur codant une protéine de fusion hepcidine-GFP.
- 3 - D'initier une étude dont l'objectif est de déterminer la relevance de nouvelles nanoparticules de poly-acide malique (PMLA) utilisées pour véhiculer des drogues anticancéreuses notamment pour cibler le carcinome hépatocellulaire.

Les résultats s'organisent donc en trois parties :

RESULTAT 1 : Partie A : Transfert de gènes dans les cellules d'hépatome humain HepaRG. Application à la surexpression du cytochrome P4502E1. Partie B : Répression par siARN de l'expression du récepteur AhR. Application à l'étude de l'induction des CYP1A1 et 1A2 par des amines aromatiques hétérocycliques.

RESULTAT 2 : Etablissement d'une lignée recombinante HepaRG exprimant de façon stable une protéine de fusion hepcidine-GFP.

RESULTAT 3 : Evaluation de toxicité in vitro de nanoparticules de poly-acide malique sur des lignées cellulaires et étude de leur pouvoir d'encapsulation de doxorubicine.



RESULTATS

*« En sentiment comme en chimie, rien ne se crée, rien ne se perd » Alfred Capus
Extrait de « Les pensées »*

Résultats 1.

Transfert de gènes dans les cellules HepaRG

Partie A.

Application à la surexpression du cytochrome P450E1

Article 1.

Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies

Veronique Laurent¹⁻⁵, Aurore Fraix²⁻⁵, Tristan Montier³⁻⁵, Sandrine Cammas-Marion⁴⁻⁵, Catherine Ribault¹, Thierry Benvegna⁴⁻⁵, Paul-Alain Jaffres²⁻⁵ and Pascal Loyer¹⁻⁵

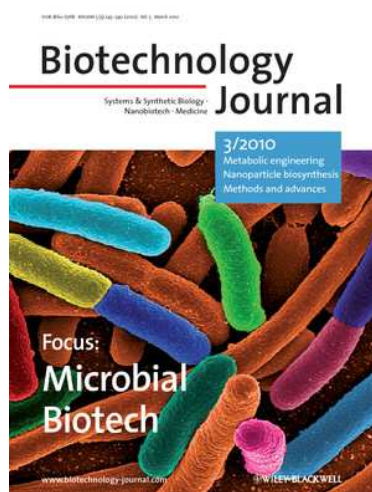
¹INSERM U991, IFR140, Université de Rennes 1, Foie, Métabolisme et Cancer, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

²CEMCA, Equipe Phosphore et vectorisation, UMR 6521 CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

³INSERM U613, Génétique Moléculaire et Epidémiologie Génétique, Hôpital Morvan, CHU de Brest, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, Brest, France

⁴Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), UMR 6226 CNRS Sciences chimiques de Rennes, Equipe Chimie organique et supramoléculaire, Université Européenne de Bretagne, Rennes, France

⁵Plateforme IBiSA SynNanoVect, Biogenouest®, Brest-Rennes, France



Biotechnol J, 2010, 5, 314-320.

I. Introduction

En raison de l'intérêt grandissant pour les cellules HepaRG dans les études du métabolisme des drogues et des processus de différenciation des cellules progénitrices en cellules différenciées, l'optimisation de la transfection des cellules HepaRG est devenue une question pertinente. En effet, les cellules progénitrices HepaRG (Cerec et al, 2007; Gripon et al, 2002) sont capables de se différencier en hépatocytes exprimant un large éventail de fonctions spécifiques du foie.

Cependant, ces cellules expriment un niveau relativement limité d'un important cytochrome P450, le CYP2E1, limitant leur utilisation pour les études de toxicologie des drogues métabolisées par cette voie. En effet, les cellules HepaRG expriment seulement ~13% de messagers ARNm CYP2E1 en comparaison des hépatocytes humains normaux en culture primaire (Aninat et al, 2006). En surexprimant CYP2E1, nous disposerions d'un modèle hépatocytaire complémentaire à la lignée HepaRG « mère » qui permettrait d'étudier la toxicité ou le métabolisme de drogues prises en charge par ce CYP.

Le but de ce travail était dans un premier temps d'établir des protocoles efficaces de transfection des cellules HepaRG progénitrices et différenciées HepaRG cells, et dans un second temps d'obtenir une surexpression de la protéine CYP2E1. L'article figure en annexe 7.

II. Résultats

1. Transfection par les réactifs commerciaux

Un panel de réactifs de transfection du commerce et le vecteur d'expression pEGFP-C3 codant la protéine GFP (Annexe 8) ont été utilisés pour transfecter les cellules HepaRG. Les cellules vivantes positives pour la GFP (GFP+) étaient détectées 48 heures après transfection en cytométrie en flux (figure 1).

La moyenne de fluorescence était déterminée au sein de la population cellulaire GFP+. Pour déterminer le contrôle de la fluorescence, les cellules HepaRG étaient transfectées avec un plasmide non codant pC3 (pEGFP-C3 délété du cDNA GFP). Les cellules non transfectées constituent de mauvais témoins car quel que soit le plasmide transfecté, la taille, la granularité et l'autofluorescence des cellules incubées en présence des réactifs de transfection changent. La viabilité cellulaire est estimée en utilisant la taille (side scatter, SSC) versus la granularité (forward scatter, FSC). Les expériences préalables ont montré une diminution nette de la taille (FSC) et une augmentation de la structure (SSC) dans les cellules HepaRG en nécrose ou en apoptose comparées aux cellules viables. Les cellules GFP+ ont été visualisées par un microscope à fluorescence Zeiss® fluorescent et le logiciel AxioVision® LE Rel. 4.3.

Dans les cellules HepaRG progénitrices (panel A), la Lipofectamine 2000® était le plus puissant réactif de transfection avec une efficacité de 25% de cellules GFP+ mais avec une forte toxicité. Les autres réactifs ont permis l'expression de la GFP dans seulement 10 à 15% des cellules. Dans les cellules différenciées, les taux de transfection étaient très faibles (1 à 14%), souvent inférieurs aux cellules progénitrices. Ces tests ont confirmé les résultats antérieurs de l'équipe, soit environ 20% de cellules GFP+ avec ces molécules commerciales. Les meilleurs transfectants des cellules différenciées sont la TransFectin, le JetPEI-Hepatocyte et le JetPEI mais avec une forte toxicité. In situ, la détection des cellules différenciées montre que les cellules GFP+ sont majoritairement biliaires et que la proportion d'hépatocytes transfectés est estimée à moins de 5%.

Les molécules testées ne parviennent pas à assurer à la fois une efficacité suffisante pour obtenir un effet biologique associé et une faible toxicité. C'est pourquoi, des nouvelles méthodes de transfert de gènes ont été évaluées.

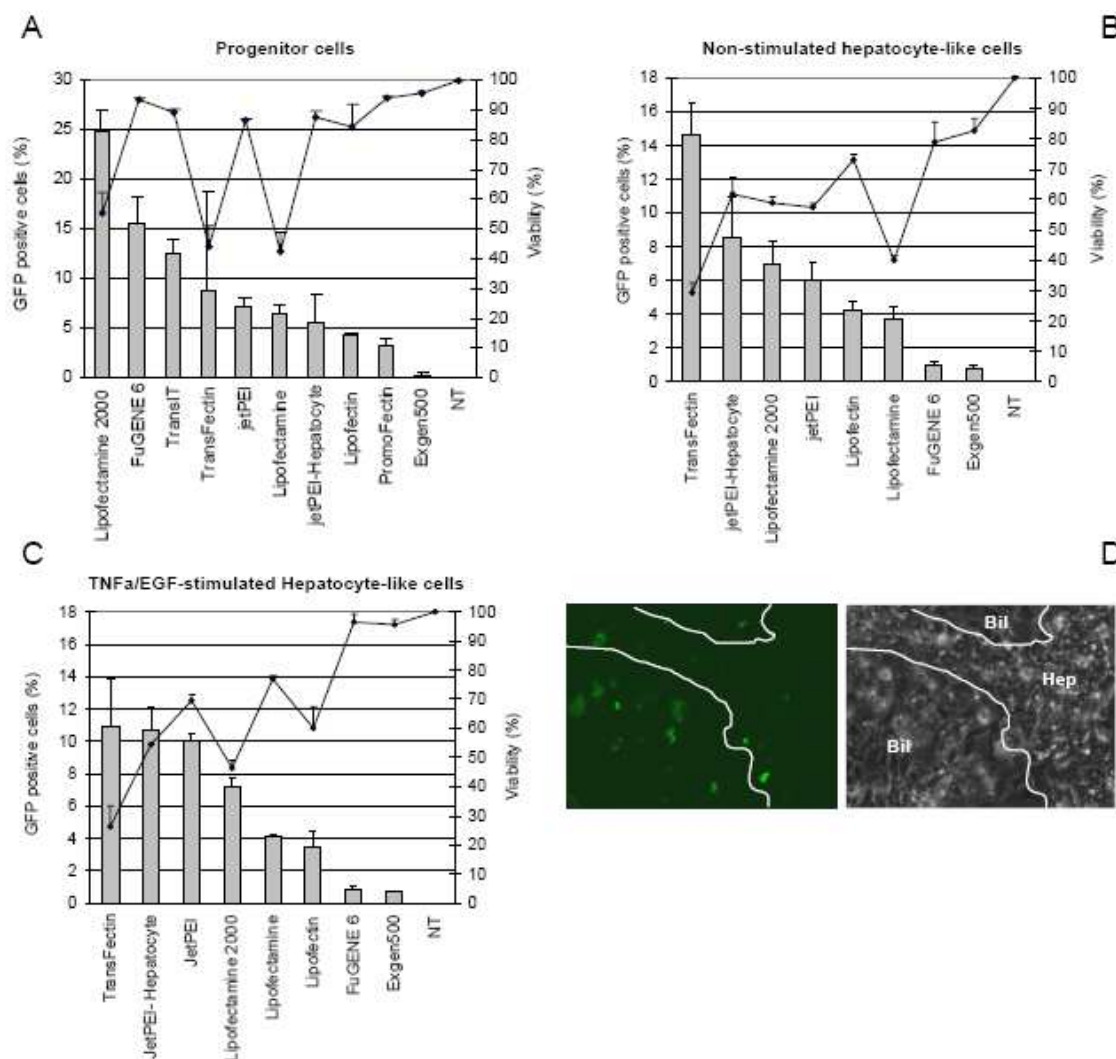


Figure 1. Transfection des cellules HepaRG cells par des réactifs commerciaux.

Les efficacités de transfection ont été analysées dans les cellules HepaRG progénitrices et différenciées avec un panel de réactifs commerciaux communément utilisés et le vecteur d'expression pEGFP-C3 codant le gène rapporteur GFP. Les réactifs utilisés selon les recommandations du fabricant étaient : Lipofectin®, Lipofectamine™, Lipofectamine™ 2000, FuGENE® 6, TransIT-TKO®, TransFectin™, JetPEI™, JetPEI™-Hepatocyte, PromoFectin-Hepatocyte et Exgen 500.

Les histogrammes indiquent le pourcentage de cellules GFP+, les courbes la viabilité cellulaire. Les résultats sont présentés par ordre décroissant d'efficacité de transfection.

Dans les cellules HepaRG progénitrices (panel A), la Lipofectamine 2000® était le plus puissant réactif de transfection avec une efficacité de 25% de cellules GFP+. Cependant, la viabilité a diminué considérablement pour atteindre 55% comparés aux cellules contrôle non transfectées (100% cellules viables). Le FuGENE 6 et le TransIT, qui n'affectent pas beaucoup la viabilité, permettent l'expression de la GFP dans seulement 15 et 10% des cellules, respectivement. Pour la TransFectin, le JetPEI, la Lipofectamine, le JetPEI-hepatocyte, la Lipofectin, la PromoFectin et l'Exgen500, l'efficacité de transfection reste en dessous de 10% avec une viabilité d'environ 85% du contrôle sauf la TransFectin et la Lipofectamine qui induisent une forte cytotoxicité.

Pour les cellules HepaRG différenciées, deux conditions de culture étaient utilisées : des cellules non stimulées (panel B) maintenues en milieu standard de culture et des cellules stimulées par 1 ng/mL de TNF α et 25 ng/mL d'EGF (panel C), un cocktail mitogénique stimulant la prolifération des hépatocytes différenciés. Cette condition de culture a été utilisée depuis que l'efficacité de transfection dans les hépatocytes humains normaux a été montrée supérieure lorsque les hépatocytes étaient stimulés pour proliférer. A la fois, dans les cellules stimulées ou non, les taux de transfection étaient inférieurs à ceux observés avec les cellules progénitrices. La TransFectin, le JetPEI-Hepatocyte et le JetPEI étaient les réactifs les plus puissants, qui ont donné de faibles taux de transfection (<10%) dans les cellules progénitrices alors que la stimulation par l'addition de TNF α et d'EGF n'était pas associée de façon significative à une augmentation de l'efficacité de transfection. De plus, les taux les plus élevés de transfection étaient associés à de forts effets cytotoxiques. La détection in situ des cellules GFP+ en monocouche des cellules HepaRG différenciées incluant des hépatocytes et des cellules biliaires, a démontré que la plupart des cellules transfectées étaient majoritairement de type biliaire (panel D). (Hep) Cellules de type hépatocytaire ; (Bil) biliaire (D). Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes incluant des échantillons en triplicat.

2. Transfection par des lipides cationiques

Les deux laboratoires de chimie de la plate-forme **SynNanoVect** synthétisent des lipides cationiques dans le but de vectoriser des biomolécules ou principes actifs vers des cellules in vitro ou in vivo.

La plate-forme d'exploration fonctionnelle **SynNanoVect** (Biogenouest®) labellisée IBiSA depuis 2008 est née du partenariat scientifique des unités de biologie INSERM U613 à Brest (Férec, Montier, Delépine, Le Gall et coll.), INSERM U991 à Rennes (Guillouzo, Loyer et coll.) et des unités de chimie UMR CNRS 6521 (Jaffrès et coll., Brest) et UMR CNRS 6226 (ENSCR, Benvegny et coll.) à Rennes. Elle a notamment pour mission de développer de nouveaux nanovecteurs (Plate-forme de production de nanovecteurs synthétiques pour le transfert de gènes et de biomolécules d'intérêt thérapeutique, SynNanoVect <http://www.synnanovect.ueb.fr>).

L'équipe « Phosphore et Vectorisation » (UMR CNRS 6521) de Jaffrès, Clément, des Abbayes et Yaouanc, travaille sur la chimie du phosphore et du lipide. Elle développe une famille de vecteurs de type phosphonolipides dont la tête polaire a d'abord été constituée par un ammonium, puis un phosphonium et enfin un arsenium. L'équipe de Benvegny et Cammas-Marion et Plusquellec (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, UMR CNRS 6226) a opté pour le développement de composés dérivés de la glycine bêtaïne et depuis quelques années des lipides dérivés d'archaebactéries et de nouveaux polymères dérivés de l'acide malique pour la synthèse de nanoparticules. Les quatre équipes de SynNanoVect collaborent avec le Centre de biophysique moléculaire UPR 4301 à Orléans (Midoux, Pichon, et coll.), le laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire INSERM U646 à Angers (Benoît, Passirani et coll.), le laboratoire de Vectorisation de macromolécules biologiques et impact fonctionnel INSERM U 915/ IN-CELL-ART à Nantes (Pitard et coll.), Tours et Villejuif.

Nous avons sélectionné plusieurs molécules issues de cette plate-forme pour réaliser un large criblage de conditions de transfection des cellules HepaRG progénitrices.

140 conditions de transfection ont été testées, soit une première sélection des conditions les plus pertinentes en comparant avec le transfectant commercial Promofectin-Hepatocyte® :

- Quantité d'ADN : 0,4 ou 0,8 µg pEGFP / 50 000 cellules
- Lipide : MM18 ou KLN 47
- Colipide couplé au MM18 : DOPE, Cholestérol et GR à 5%, 15% et 50%
- 5 rapports de charge : R+ (sans ADN) - R 0,5 - R1 - R2 - R4 - R8

Plusieurs conditions se sont distinguées : 20 % et 13 % pour le KLN 47, 10% pour le MM18 couplé au cholestérol (figure 2). En revanche, le commercial Promofectin-Hepatocyte® atteignait seulement 7% et pour les deux autres colipides GR et DOPE, les efficacités étaient inférieures à 5%.

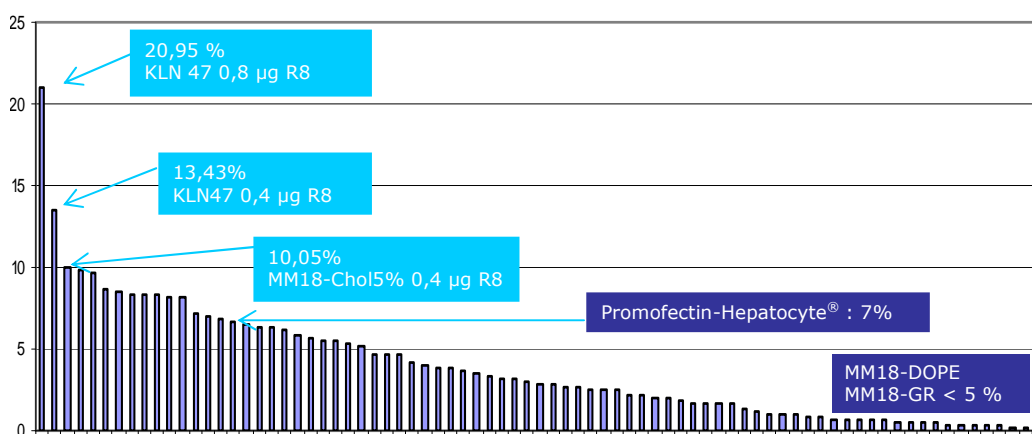


Figure 2. Première sélection des conditions de transfection par lipides cationiques.

Ces expériences préalables ont permis de mettre au point nos conditions expérimentales et de souligner l'importance de plusieurs paramètres notamment la quantité d'ADN, la nature du lipide et du colipide ou encore le rapport de charge. D'autre part, une forte auto-fluorescence des liposomes comme le MM18-DOPE 50% a été détectée sans ADN, d'où la nécessité de transfecter avec un plasmide non codant tel pC3 pour avoir un bon témoin de transfection.

La transfection a ensuite été optimisée en :

- supprimant le sérum dans le milieu d'incubation des complexes
- ensemençant à une faible densité (90 000 cellules sont préférables à 100 000 pour une surface de $\sim 1 \text{ cm}^2$, soit le puits des multiwell de 24)
- veillant à l'homogénéité de l'ensemencement
- utilisant des liposomes récemment synthétisés
- soniquant les liposomes avant utilisation
- ajustant le volume d'OptiMEM pour la complexation ADN/liposomes et le volume du milieu sans sérum pour l'incubation des complexes avec les cellules

Une concentration élevée des liposomes, conduisant à la formation de complexes plus petits, ainsi que l'ordre lors de la formulation des lipoplexes (ajout de l'ADN sur les liposomes ou des liposomes sur l'ADN) ne semblent pas influencer les résultats. En tenant compte de ces optimisations, les efficacités ont pu être doublées. Deux molécules, le KLN47 (efficacité $\sim 40\%$) et le MM18 ($\sim 20\%$), ont été gardées pour des expériences complémentaires.

De plus, quatre nouveaux lipides synthétisés par l'équipe du Pr P-A. Jaffrès ont été testés : les molécules GLB43, EG316, KLN25 et BSV10. Toutes les structures des lipides utilisés dans les expériences présentées dans ce chapitre sont précisées dans la figure ci-après.

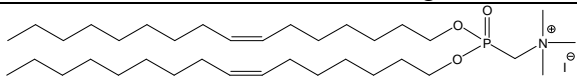
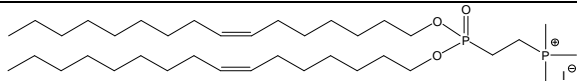
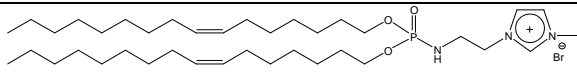
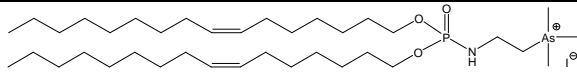
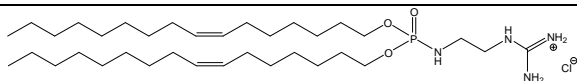
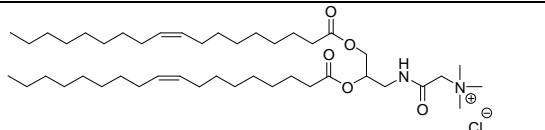
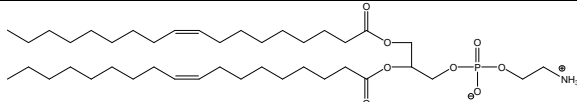
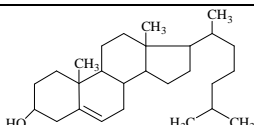
Structure and labelling
 <p>GLB43</p>
 <p>EG316</p>
 <p>KLN25</p>
 <p>KLN47</p>
 <p>BSV10</p>
 <p>MM18</p>
 <p>DOPE</p>
 <p>CHOLESTEROL (Chol)</p>

Figure 3. Structure des lipides et colipides.

Les vecteurs synthétiques GLB43, EG316, KLN25, KLN 47 et BSV10 sont constitués par un groupe fonctionnel phosphore (phosphonate ou phosphoramidate) reliant la partie lipidique et la tête cationique. Ils ont été utilisés pour la délivrance d'ADN plasmidique in vitro et in vivo dans les cellules non hépatiques comme en témoignent les références bibliographiques ci-après.

Les protocoles de synthèse des molécules KLN 25 et du MM18 sont les suivants :

Synthèse du KLN25

Un excès de 1-méthylimidazole (950 μL , 15 mmol) a été ajouté à du *O,O'*-dioleil-N-2-bromoethylphosphoramidate (2.284 g, 3.2 mmol, 1eq.). Le mélange a été agité 3 jours à 40 °C. L'excès de 1-méthylimidazole a été enlevé par distillation de Kugelrohr (1h30, 120°C, 3.10^{-2} torr). Le résidu a été dissous dans du dichlorométhane et lavé à l'eau. La

couche organique a été séchée sous MgSO_4 , filtrée et concentrée. Le composé attendu est obtenu sous forme d'une huile brune avec un rendement de 76%. Le composé KLN25 a été caractérisé entièrement par spectroscopie RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) et ^{31}P (121.49 MHz) (Spectromètres Bruker AC 300 et DRX 400). Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz. Les abréviations suivantes ont été utilisées : s pour singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m pour multiplet. L'analyse MALDI TOF MS a été menée sur un spectromètre de masse Bruker Autoflex TOF/TOF réglé en mode « réflectron ». Le Dithranol (Bruker, #209783) a été utilisé comme matrice.

^1H NMR (400.11 MHz; CDCl_3): 0.85 (t, 6H, CH_3 fatty chain, $^3J_{\text{H-H}}$: 6.5 Hz), 1.23 (m, 44H, CH_2 fatty chain), 1.63 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.99 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$), 3.15 (m, 1H, NH), 3.48 (m, 2H, NH-CH_2), 3.93 (q, 4H, O-CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = ^3J_{\text{P-H}} = 6.6$ Hz), 4.01 (s, 3H, N-CH_3), 4.52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 5.33 (m, 4H, CH=CH), 7.15 and 7.39 (2s, 2H, N-CH=CH-N), 10.06 (s, 1H, N=CH-N). **^{13}C NMR** (100.62 MHz; CDCl_3): 14.1 (s, CH_3 fatty chain), from 22.8 to 32.0 (several s, CH_2 fatty chain), 30.3 (d, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $^3J_{\text{P-C}} = 6.2$ Hz), 36.9 (s, $\text{CH}_3\text{-N}$), 41.4 (s, NH-CH_2), 50.9 (s, $\text{CH}_2\text{-N}$), 66.7 (d, O-CH_2 , $^2J_{\text{P-C}} = 5.6$ Hz), 122.8 and 123.1 (2s, N-CH=CH-N), 129.7 and 130.0 (2s, CH=CH), 137.6 (s, N=CH-N). **^{31}P NMR** (121.49 MHz; CDCl_3): 9.1. MS (MALDI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{81}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}^+$ (M) 706.601; found 706.472.

Synthèse du MM18

1. Synthèse du 3-betainylthiazolidine-2-thione chloride

Une solution de thionyl chloride (25,6 mmol, 1,5 eq.) dans de l'acetonitrile anhydre (40 ml) a été ajoutée goutte à goutte à une suspension acetonitrile (10 ml) de glycine bêtaïne (17 mmol, 1 eq.), avant d'être séchée à 50°C pendant 4 jours. Le mélange a été gardé à 35-40 °C pendant 1 h sous atmosphère azote. Après concentration sous pression réduite, l'acyl chloride (17 mmol, 1 eq.) a été dissous dans du dichlorométhane anhydre (20 ml). Du thiazolidine thione (18&8 mmol, 1,1 eq.) et de la triéthylamine (17 mmol, 1 eq.), solubilisés dans 60 mL de dichlorométhane anhydre, ont été ajoutés à 0°C. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 30 min. Après concentration sous pression réduite, le précipité a été lavé deux fois dans du dichlorométhane et filtré pour obtenir de la glycine bêtaïne activée (rendement = 70%) comme une poudre jaune. **F** = 140°C (litt. : 141°C).

^1H NMR (DMSO d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 3.30 (s, 9H, H-1), 3.47-3.51 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-5), 4.55-4.60 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-4), 5.25 (s, 2H, H-2).

^{13}C NMR (DMSO d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 28.89 (C-4), 52.96 (C-1), 55.43 (C-5), 66.54 (C-2), 165.01 (C-3), 202.11 (C-6).

FT-IR (nujol) ν (cm^{-1}) : 1692 (C-3) - **HRMS (ESI)** : $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{ON}_2\text{S}_2\text{Cl}$ $[\text{M}]^+$ m/z theoretical = 219,0626; measured = 219,0623 - **Elemental analysis** : $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{ON}_2\text{S}_2\text{Cl}$, $0.5\text{H}_2\text{O}$: theoretical: C = 36,42 %, H = 6,11 %, N = 10,62 %, S = 24,31 % ; measured: C = 36,33 %, H = 6,24 %, N = 10,89 %, S = 24,97 %

Synthèse du 1-betainylamino-propane-2,3-diol chloride

La glycine bêtaïne active (7.85 mmol, 1.09 eq.) a été ajoutée lentement à 0°C à une solution DMF (80 ml) de aminopropane diol (7.2 mmol, 1 eq.), avant d'être séchée sous vide pendant 1h. Le mélange a été agité à 0°C pendant 2 heures en atmosphère nitrogen. Après concentration sous pression réduite, le résidu était dissous dans une solution 32% $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ (25/1) et agité pendant 30 min. La phase aqueuse a été lavée 3 fois avec de l'éthyl acétate, concentrée en pression réduite et lyophilisée, conduisant au diol attendu obtenu sous forme d'une huile brune.

^1H NMR (DMSO d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 2.98-3.04 (m, 1H, H-4 α), 3.22 (s, 9H, H-1), 3.26-3.36 (m, 3H, H-4 β , H-6), 3.51-3.53 (m, 1H, H-5), 4.16 (s, 2H, H-2), 8.87 (sl, 1H, NH).

^{13}C NMR (DMSO d_6 , 100 MHz) δ (ppm) : 42.33 (C-4), 53.31 (C-1), 63.66 (C-6), 64.16 (C-2), 69.96 (C-5), 163.37 (C-3).

2. Synthèse du 1-betainylthiazolidine-2,3-dioleoyloxypropane chloride, MM18

Les pyridine anhydre (20,3 mmol, 3,34 eq.) et N,N-diméthylaminopyridine (4,08 mmol, 0,67 eq.) ont été ajoutées à une solution d'anhydre DMF (50 ml) de 1-betainylamino-propane-2,3-diol chloride (6,09 mmol, 1 eq.). Une solution ether diéthyl anhydre (40 mL) de oléoyl chloride (20,3 mmol, 3,34 eq.) a été ajoutée goutte à goutte à la solution précédente à 0°C pendant 1 heure. Le mélange a été chauffé pendant 7 jours sous atmosphère d'azote. Après concentration sous vide, le résidu a été dissous dans de l'eau et agité avec une solution de n-hexane/butanol (1/1) jusqu'à solubilisation totale. La phase organique a été neutralisée par une solution saturée de NaHCO₃. La phase aqueuse a été lavée par du n-hexane/butanol (1/1). Les phases organiques ont été collectées, lavées, séchées sous MgSO₄, filtrées et concentrées sous vide. Le produit a ensuite été purifié sur une colonne de chromatographie en silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, R_f = 0.3) produisant le MM 18 (rendement = 23%) sous forme de solide blanc collant.

F = 109°C (litt. :109°C)

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) : 0.83-0.87 (m, 6H, H-14, H-22), 1.22-1.26 (2s, 40H, (CH₂)₄, (CH₂)₆), 1.57 (m, 4H, H-9, H-17), 1.98 (m, 8H, H-10, H-13, H-18, H-21), 2.26-2.38 (m, 4H, H-8, H-16), 3.35 (m, 1H, H-4α), 3.43 (s, 9H, H-1), 3.60-3.64 (m, 1H, H-4β), 4.04-4.10 (m, 2H, H-6), 4.23-4.26 (m, 2H, H-2), 5.13-5.18 (m, 1H, H-5), 5.28-5.36 (m, 4H, H-11, H-12, H-19, H-20), 9.20 (sl, 1H, NH).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 14.05 (C-14, C-22), 27.15-31.83 (20 CH₂, C-9, C-10, C-13, C-17, C-18, C-21), 34.18 (C-8, C-16), 40.21 (C-4), 54.61 (C-1), 62.82 (C-6), 64.71 (C-2), 70.70 (C-5), 129.93 (C-11, C-12, C-19, C-20), 163.76 (C-3), 173.40 (C-7, C-15).

SM-Electrospray: C₄₄H₈₃N₂O₅Cl [M⁺] m/z theoretical = 719.6302, measured = 719.6314 - **Elemental analysis** C₄₄H₈₃O₅N₂C l : theoretical : C = 67.56 %, H = 11.00 %, N = 3.58 % ; measured: C = 67.27 %, H = 10.91 %, N = 3.62 % - **FT-IR (nujol) ν (cm⁻¹)**: 1738, 1728 (COO), 1680 (CONH), 1575 (CONH).

La synthèse des autres composés a été décrite précédemment dans ces publications :

Références bibliographiques des lipides et colipides de la plate-forme SynNanovect utilisés pour la délivrance d'ADN in vitro et in vitro.

Mével, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C. *et al.*, Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids : high efficiency of an imidazolium derivative. *Chem. Bio. Chem.*, 2008, 9, 1462-1471.

Le Bolc'h, G., Le Bris, N., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C. *et al.*, Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection. *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 6681-6684.

Audrezet, M.P., Le Bolc'h, G., Floch, V., Yaouanc, J.J. *et al.*, Novel cationic phosphonolipids agents for in vitro gene transfer to epithelial cell lines. *J. Liposome Res.* 1997, 7, 273-300.

Floch, V., Audrezet, M.P., Guillaume, C., Gobin, E. *et al.*, Transgene expression kinetics after transfection with cationic phosphonolipids in hematopoietic non adherent cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1371, 53-70.

Floch, V., Le Bolc'h, G., Gable-Guillaume, C., Le Bris, N. *et al.*, Phosphonolipids as non-viral vectors for gene therapy. *Eur. J. Med. Chem.*, 1998, 33, 923-934.

Floch, V., Loisel, S., Guenin, E., Hervé, A.-C. *et al.*, Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 4617-28.

Guénin, E., Hervé, A.-C., Floch, V., Loisel, S. *et al.* Cationic phosphonolipids containing quaternary phosphonium and arsonium groups for DNA transfection with good efficiency and low cellular toxicity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, 39, 629-631.

Picquet, E., Le Ny, K., Delépine, P., Montier, T. *et al.*, Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery. *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 1051-1053.

Lamarche, F., Mével, M., Montier, T., Burel-Deschamps, L. *et al.*, Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18, 1575-1582

Mével, M., Montier, T., Lamarche, F., Delépine, P. *et al.*, Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18, 1604-1611.

Les méthodes de préparation des liposomes et lipoplexes sont décrites ci-après :

Préparation des liposomes et des lipoplexes

Préparation des liposomes de type lipophosphonates et lipophosphoramidates

Un film lipidique a été préparé dans des tubes à fond rond (10 mL) en séchant une solution chloroforme de lipide cationique (10,8 mM, 0,5 mL). Le film a été hydraté pendant un temps optimisé dans l'eau (1 à 2 mL). Ensuite, la solution a été vortexée pendant 1 min et soniquée 1 à 4 x 10 min à 45 kHz en utilisant un bain à ultrasons VWR. Pour les liposomes comprenant un lipide cationique et un colipide, le même protocole a été utilisé à part le film lipidique qui a été obtenu en séchant une solution chloroforme du lipide cationique et du colipide (10,8 mM, 0,5 mL, rapport molaire 1:1). Les solutions liposomales, préalablement soniquées 5 min, (1,5 mM, 80,8 μ L, 0,1212 μ mol charge positive) ont été diluées dans de l'eau (919,2 μ L). L'ADN plasmidique (40 μ L, 1 μ g/ μ L, 0,1212 μ mol charge négative) dans 960 μ L d'eau a été ajouté à la solution liposomale, et le mélange incubé au moins 30 min à température ambiante. Pour les mesures de taille et de potentiel Zeta (potentiel ζ), 100 μ L de solution liposomale ont été dilués dans 3,5 mL d'eau ou la solution de lipoplexes a été diluée dans 1 mL d'eau. Le **potentiel Zeta** correspond à la charge de surface de particules en suspension dans un milieu liquide, rendant compte des interactions entre particules et espèces chargées en solution. Leur potentiel ζ a été mesuré par mobilité électrophorétique avec un ZetaSizer 3000 HSA (Malvern Instruments) utilisant les paramètres suivants : viscosité, 0,891 cP; constante diélectrique constant, 79; température, 25°C; F(Ka), 1.50 (Smoluchowsky). Les mesures ont été réalisées 5 fois. Le potentiel ζ a été calculé avec l'approximation de Smoluchowsky. La taille des liposomes et des lipoplexes a été mesurée par diffusion de la lumière ou QUELS (faisceau laser) avec le ZetaSizer 3000 HSA dans l'eau avec un index de réfraction de 1,59, une viscosité de 0.89 et une température de 25°C. Le système a été calibré avec le polymère polystyrène 200 \pm 5 nm (Duke Scientific Corps., Palo Alto, CA). Le diamètre des liposomes et des lipoplexes a été calculé selon un mode « contin ».

Préparation des liposomes MM18

Les liposomes de type MM18/colipide (85/15 wt%) ont été préparés en dissolvant le MM18 (0,85 mL, 1mg/mL) et le colipide [cholestérol (Chol) ou dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE), (0.15 mL, 1 mg/mL)] dans une solution chloroforme. La solution chloroforme a été évaporée en utilisant un évaporateur rotatif et le film lipidique a été séché sous vide poussé à température ambiante. Le film a été hydraté avec 1 mL d'eau stérile à 4°C pendant 12 heures et soniqué 2 fois pendant 5 min. La taille et le potentiel ζ du liposome ont été mesurés en utilisant un appareil DelsaNano® (Beckman Coulter).

Préparation des lipoplexes

Les suspensions de liposomes (10 mg lipides/mL) ont été soniquées en utilisant le bain à ultrasons deux fois 5 minutes entre lesquelles, elles ont été vortexées. Les liposomes et les plasmides (0.5 μ g) ont été dilués dans 100 μ L de milieu OptiMEM (Gibco) avant d'être mélangés. Les solutions de lipoplexes qui en résultent ont été vortexées immédiatement, incubées à température ambiante 30 min, ajoutées goutte à goutte au milieu de culture des cellules HepaRG sans sérum ni antibiotique et incubées 4 h avec les cellules avant de remplacer le milieu par du milieu de culture complet.

Dans une première approche, les cellules HepaRG progénitrices adhérentes ont été transfectées par ces lipides cationiques et nos résultats montrent l'effet du rapport de charge lipide/ADN et du colipide (figure 4) :

- les lipophosphonates EG316 (A) et GLB43 (B)
- les lipophosphoramidates KLN25 (C), BSV10 (D) et KLN47 (F)
- le lipide glycine bêtaïne MM18 (E)
- tous ont été complexés avec 0,8 μ g de vecteur pEGFPC3 pour 10⁵ cellulesensemencées dans des plaques 24 puits 24 h avant la transfection.

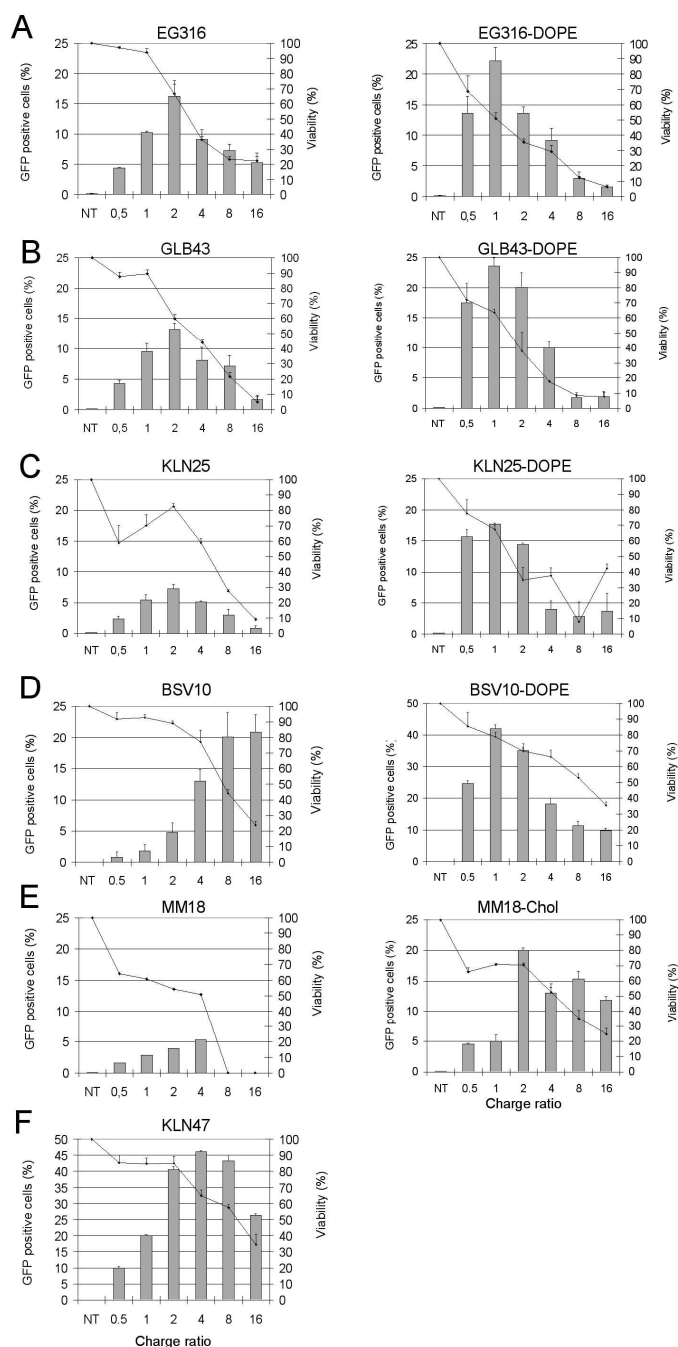


Figure 4. Transfection des cellules HepaRG par des lipides cationiques appartenant aux lipophosphonates, lipophosphoramidates et lipides glycine bétaine.

Les lipophosphonates EG316 (A) et GLB43 (B) et lipophosphoramidate KLN25 (C), BSV10 (D) et KLN47 (F) et le lipide glycine bétaine MM18 (E) ont été utilisés pour transfecter des cellules HepaRG progénitrices. Les lipides cationiques étaient soit utilisés seuls (colonne de gauche) soit combinés avec un colipide neutre DOPE (50%) ou cholestérol (15% Chol) (colonne de droite) et ce à différents rapports de charge (de 0,5 à 16 : axe des abscisses). Le KLN47 a été utilisé seul car il a été montré que son association avec la DOPE et le cholestérol réduisait fortement la délivrance d'ADN plasmidique.

10^5 cellules étaient transfectées avec 0,8 μ g de vecteur d'expression pEGFPC3. L'expression de la GFP et la viabilité cellulaire ont été détectées par cytométrie en flux 48 h après transfection. Le témoin de fluorescence a été déterminé avec les mêmes formulations de lipides cationiques et le plasmide pC3 non codant. Les résultats des trois expériences indépendantes sont exprimés en pourcentage de cellules GFP positives (histogrammes) et la viabilité cellulaire (courbes) comparée aux cellules non transfectées (NT).

Sans colipide :

Pour EG316, GLB43 et KLN25 (figures A-C), les meilleurs résultats sont obtenus pour le rapport de charge **R2** avec une viabilité acceptable à environ 60%. Pour des rapports de charge (R) supérieurs à 2, la viabilité décroît de façon considérable.

Pour le BSV10 et le MM18 (figures E-D), l'efficacité augmente avec le rapport de charge, respectivement de 20% à **R8** et à **R16**, et de 5% à **R4**, mais là encore la viabilité décroît quand R augmente.

Pour le KLN47 (figure F), le maximum d'efficacité est de 45 % à R4, avec 65% de viabilité.

Avec colipide :

Pour EG316, GLB43, KLN25 et BSV10, l'efficacité est meilleure à **R1 au lieu de R2 pour EG316, GLB43 et KLN25 et au lieu de R8/R16 pour BSV10 sans colipide**, comme en témoignent les 40% d'efficacité pour le BSV10-DOPE avec une viabilité de 80%. Pour MM18 formulé avec 15% de cholestérol, l'efficacité est meilleure à **R2 au lieu de R4 sans colipide**, et passe de 5% à 20% d'efficacité et de 50% à 80% de viabilité. Le bénéfice du colipide DOPE est probablement dû à sa capacité à induire une transition du complexe liposome/ADN d'une phase lamellaire à non lamellaire au niveau intracellulaire, qui favorise le relargage d'ADN.

La viabilité diminue en général quand le rapport de charge augmente. Dans l'ensemble, la présence de colipides augmente l'efficacité, tout en diminuant la valeur du rapport de charge et permettant l'efficacité la plus élevée.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur les cellules différenciées, les résultats n'ont pas donné de meilleures efficacités de transfection avec les molécules de la plate-forme par rapport aux molécules commerciales.

Le but est de trouver des conditions alliant bonnes efficacités et viabilités, comme les lipides KLN47 et BSV10/DOPE qui permettent d'atteindre **presque 50% de cellules GFP+ avec une faible toxicité** (60% pour le KLN47 et 80% pour le BSV10/DOPE) à l'exception des cellules HepaRG différenciées quiescentes, en accord avec le fait que le transfert de gènes par les liposomes dépende du niveau de prolifération cellulaire.

Pour étudier la corrélation entre l'efficacité de transfection et les lipides utilisés, les chimistes établissent des fiches de formulations (Annexe 11) et ont déterminé les paramètres physico-chimiques des lipides avec et sans colipide : taille, potentiel Zeta, temps d'hydratation (figure 5). La présence de DOPE n'entraîne pas toujours de diminution de la taille, en revanche, c'est le cas pour le BSV10 dont la taille diminue de 30% en présence de DOPE (de 224 à 155 nm) et qui donne la meilleure efficacité de transfection. Les tailles, charges, et le temps d'hydratation, demandés par les revues, n'expliquent pas l'efficacité de transfection selon les liposomes.

Lipides cationiques	Colipides	Diamètre moyen (nm)	Potentiel ξ (mV)	Temps d'hydratation (jours)
MM18, 85 wt%	Chol, 15 wt%	120	63	0.5
GLB43	none	180	37	5
GLB43, 50 wt%	DOPE, 50 wt%	230	36	3
EG316	none	233	33	12
EG316, 50 wt%	DOPE, 50 wt%	136	37	12
KLN25	none	398	45	6
KLN25, 50 wt%	DOPE, 50 wt%	400	40	4
KLN47	none	180	44	1
BSV10	none	224	40	10
BSV10, 50 wt%	DOPE, 50 wt%	155	33	7

Figure 5. Paramètres physico-chimiques des liposomes. wt % : weight % (en pourcentage massique).

Comparaison liposome versus lipoplexe BSV10/DOPE (A. Fraix et P-A. Jaffrès)

A partir de nos résultats, notamment en comparant les formulations comme le BSV10/DOPE R1 qui donne la meilleure condition de transfection et les formulations peu efficaces, il était possible d'explorer le lien entre efficacité de transfection et paramètres physico-chimiques. La taille et le potentiel Zeta ont été mesurés sur le liposome BSV10/DOPE et le lipoplexe correspondant au rapport de charge R=1 (figure 7). La taille entre le liposome et le lipoplexe augmente de par la complexation à l'ADN, passant de 155 nm à 179 nm. La charge du lipoplexe devient alors négative (-35 mV) contrairement à celle du liposome qui est positive (+32 mV). Il est admis que les lipoplexes sont

chargés positivement, pour interagir avec les membranes cellulaires, chargées négativement. Si le lipoplexe est négatif, cela suggère que l'ADN est adsorbé à la surface du liposome. Dans ce cas, on obtient un lipoplexe de rapport de charge théorique de 1 qui présente paradoxalement un potentiel Zeta négatif de -35 mV, mais qui permet tout de même une transfection efficace des cellules HepaRG progénitrices.

Comparaison liposomes versus lipoplexes MM18 (S. Cammas-Marion)

Ces mesures ont été réalisées à J0 et à J7 pour mettre en évidence la stabilité des liposomes et des lipoplexes MM18 seuls et complexés à 5% de cholestérol, ce dernier donnait 10 % d'efficacité de transfection pour 0,4 µg d'ADN au rapport de charge R=8, avant optimisation (figures 6 et 7). Pour rappel, après optimisation, le MM18-Chol15% permet d'atteindre 20% d'efficacité à R=2.

Sans ADN, les histogrammes montrent que le MM18 et le MM18-Chol5% ont une répartition en taille homogène et sont comparables en taille : 700 nm environ.

Avec ADN, les courbes de taille sont relativement stables, entre 500 et 700 nm, conférant le rôle de compaction au cholestérol, jusqu'au rapport de charges R2 inclus. Les forts rapports de charge entraînent une forte augmentation de taille de l'objet transfecté (2000 nm avec cholestérol, 1250 sans cholestérol à R4) qui se traduit en général par une meilleure transfection. Toutefois, à R8, les tailles diminuent à 1000 nm, ce qui correspond au rapport de charge donnant la meilleure efficacité de transfection pour le MM18-chol5%. Par conséquent, là encore, la taille, entre les liposomes et les lipoplexes MM18 et MM18-chol5%, augmente et passe de 700 nm environ à 1000 nm, de par la complexation à l'ADN.

Les résultats sont identiques à J0 et à J7, démontrant ainsi la stabilité des molécules (Mesure physique : 100 µL dans 2mL eau).

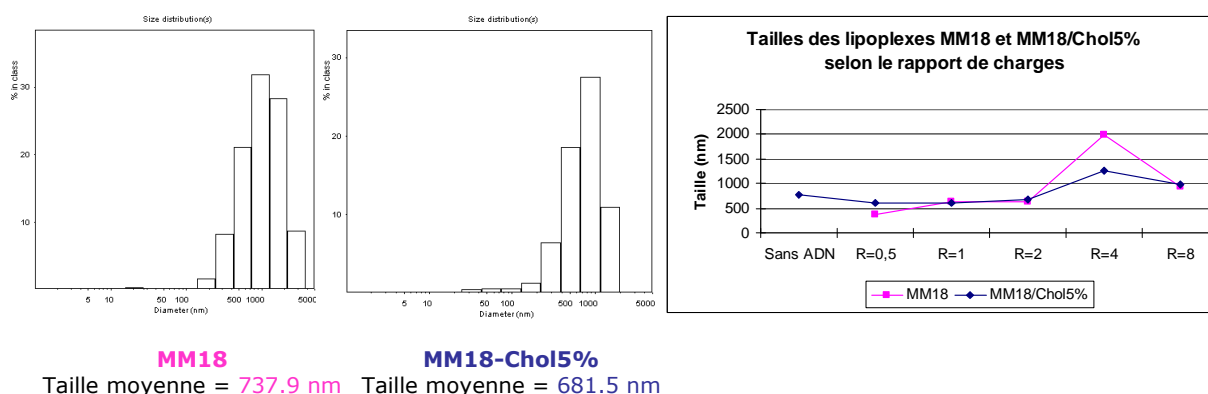


Figure 6. Mesures de la taille par diffusion de la lumière à J0 et J7 des liposomes MM18, MM18-Chol5% (histogrammes, à gauche) et des lipoplexes correspondants pour 0,4 µg d'ADN en fonction du rapport de charge (courbes rose pour MM18 et bleue pour MM18-chol5%, à droite).

	BSV10 + DOPE 50%		MM18		MM18 + Chol 5%	
	Liposome	Lipoplexe (R = 1)	Liposome	Lipoplexe (R=8)	Liposome	Lipoplexe (R=8)
Taille moyenne (nm)	155	179	737,9	1000	681,5	1000
Potentiel ξ (mV)	+ 32	- 35	ND	ND	ND	ND

Figure 7. Mesures physico-chimiques des liposomes versus lipoplexes.

Mesures du liposome et du lipoplexe dans l'OptiMEM et dans du milieu

1/ Liposome BSV-10 DOPE dans OptiMEM	2/ BSV-10 DOPE + ADN dans OptiMEM (ADN sur lipides)	3/ BSV-10 DOPE + ADN dans OptiMEM (Lipides sur ADN)
Résultats non exploitables : objets trop grands (> filtre) Échantillon pas assez concentré	Taille moyenne 600 nm, Pop homogène Zeta non exploitable : -30 ± 20 mV (normalement 0)	Même taille avec les 2 indices de réfraction et dans les 2 sens Zeta -40 ± 10 mV
4/ Lipoplexe BSV-10 DOPE/ADN + milieu sans FCS sans ATB	5/ Lipoplexe BSV10-DOPE/ADN + milieu avec FCS et ATB	
Taille 660 nm mais + hétérogène, zeta – 40 mV	Dispersion des tailles, taille moyenne 60 nm Petits objets du sérum et très gros objets dûs à fusions	

Figure 8. Mesures physico-chimiques des liposomes et des lipoplexes BSV10-DOPE 50% dans l'OptiMEM et le milieu de culture.

Les mesures physico-chimiques étant habituellement réalisées sur des liposomes en solution dans l'eau, le but était ici d'évaluer ces paramètres en conditions réelles d'utilisation, c'est-à-dire, dans l'OptiMEM, le milieu de formation des lipoplexes d'une part puis dans le milieu sans sérum et sans antibiotique d'autre part (figure 8).

- Le liposome BSV10/DOPE seul dans l'OptiMEM (1) semble présenter des objets très grands et supérieurs à la taille du filtre, la taille n'a pas pu être mesurée.
- En revanche, en présence d'ADN (2,3), les complexes sont mesurables en accord avec le rôle de compaction des liposomes. L'ordre de la formulation des complexes, lipides sur ADN ou inversement, n'a pas d'influence sur la taille des complexes, de 600 nm. Le potentiel Zeta n'est pas exploitable.
- L'incubation des lipoplexes (4,5) dans le milieu avec sérum et antibiotiques, par rapport au milieu sans sérum et sans antibiotique, montre la présence de petits objets du sérum et de très gros objets peut-être dus à des fusions. Le milieu sans sérum et sans antibiotique ne change pas la taille des lipoplexes (660 nm) par rapport à l'OptiMEM seul (600 nm), mais leur confère une charge négative.
- L'incubation dans un milieu avec sérum sans antibiotiques ou dans un milieu sans sérum avec antibiotiques permettrait de comprendre leurs rôles respectifs.

3. Transfection par microporation

Parmi les méthodes physiques, **l'électroporation est la plus utilisée**. Le nucléofecteur (Amaxa, LONZA) et le microporateur (Invitrogen, Neon™ system) en sont les plus récentes générations. Le **nucléofecteur** distribué par la société Amaxa repose sur l'utilisation d'une cuvette. Il avait été testé sur les cellules HepaRG et les hépatocytes de rat en culture primaire. Pour cette technique, les résultats ont été décevants car il a été observé de fortes toxicités, des efficacités moyennes et surtout des fusions cellulaires. Le Microporator MP100 a été évalué pour délivrer de l'ADN dans les cellules en suspension. L'appareil à l'origine conçu par Digital Bio (NanoEnTek Inc., Korea) est maintenant commercialisé sous le nom de Neon™ electroporator chez Invitrogen (Carlsbad, USA). Les cellules HepaRG progénitrices ont été détachées par trypsinisation standard à 37°C, tandis que les cellules différenciées ont été détachées sélectivement

par trypsinisation modérée à température ambiante. Les cellules ont été lavées deux fois par du PBS et resuspendues dans du tampon R (10^7 cellules/mL).

Le Microporator MP100 est caractérisé par une grande distance entre les deux électrodes tandis que leur surface a été considérablement réduite, il en résulte un champ électrique plus uniforme, des changements minimes de pH, sans production d'ions ni génération importante de chaleur. Trois paramètres ont été modulés : le voltage (V), le temps (millisecondes ou ms) et le nombre de pulses. 24 conditions (C, figure 9) ont été testées sur les cellules HepaRG progénitrices et différenciées afin de déterminer celles donnant les meilleures efficacités.

Dans les cellules **progénitrices**, 16 conditions ont donné des taux de transfection **entre 80 et 95% de cellules GFP positives** avec des **viabilités cellulaires entre 65 et 90%** (figure 9A). Les autres conditions donnaient certes des efficacités moindres, mais avec toutefois 50% de cellules GFP positives et de bons taux de viabilité.

Dans les cellules de type **hépatocytaire**, l'électroporation a également permis des efficacités élevées de transfection. Deux conditions (C5 et C4) atteignent des taux de **transfection et de viabilité de 80%** (figure 9B).

Les autres conditions mènent à des efficacités de 25 à 78% avec des viabilités très variables.

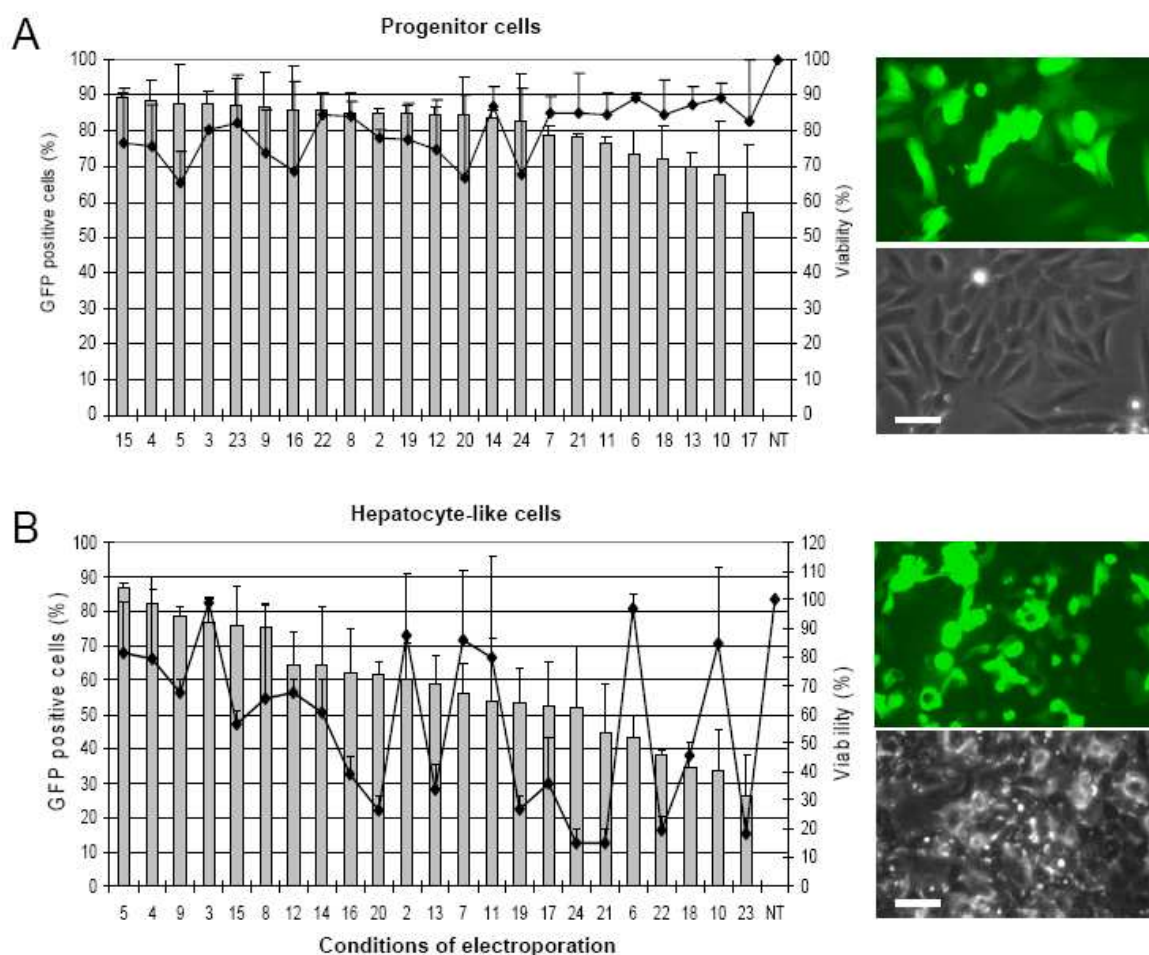


Figure 9. Transfection de cellules HepaRG progénitrices et différenciées par électroporation.

Le Microporator MP100 a été utilisé pour transfecter des cellules HepaRG progénitrices (A) et différenciées (B). 10^5 cellules ont été transfectées avec $0.5 \mu\text{g}$ de vecteur d'expression pEGFP3 codant le gène rapporteur GFP. L'expression de la GFP (histogrammes) et la viabilité cellulaire (courbes) ont été détectées par cytométrie en flux. Les résultats de trois expériences indépendantes sont exprimées en pourcentage de cellules positives pour la GFP positives et la viabilité cellulaire comparée aux cellules non transfectées contrôles (NT). Les cellules HepaRG progénitrices et différenciées exprimant la GFP ont été visualisées en microscopie à fluorescence et en contraste de phase (photographies sur le côté droit, barre blanche : $20 \mu\text{m}$).

Conditions d'électroporation : C1 = cellules non transfectées ; C2=(1400V, 20ms, 1 pulse); C3=(1500V, 20ms, 1 pulse); C4=(1600V, 20ms, 1 pulse); C5=(1700V, 20ms, 1 pulse); C6=(1100V, 30ms, 1 pulse); C7=(1200, 30ms, 1 pulse); C8=(1300V, 30ms, 1 pulse); C9=(1400V, 30ms, 1 pulse); C10=(900V, 40ms, 1 pulse); C11=(1000V, 40ms, 1 pulse) ; C12=(1100V, 40ms, 1 pulse) ; C13=(1200V, 40ms, 1 pulse) ; C14=(1100V, 20ms, 2 pulses) ; C15=(1200V, 20ms, 2 pulses) ; C16=(1300V, 20ms, 2 pulses) ; C17=(1400V, 20ms, 2 pulses) ; C18=(900V, 30ms, 2 pulses) ; C19=(1000V, 30ms, 2 pulses) ; C20=(1100V, 30ms, 2 pulses) ; C21=(1200V, 30ms, 2 pulses) ; C22=(1250V, 10ms, 3 pulses) ; C23=(1350V, 10ms, 3 pulses) ; C24=(1450V, 10ms, 3 pulses). V = volts, ms = millisecondes.

Ces données démontrent que, dans les cellules HepaRG, l'électroporation est plus efficace avec le Microporator qu'avec le nucléofecteur et que c'est également une technologie plus efficace pour le transfert de gènes par rapport à la lipofection.

Cependant, la lipofection s'adresse aux cellules adhérentes, tandis que l'électroporation aux cellules en suspension.

Les forts taux de transfection dans les cellules HepaRG différenciées obtenus par électroporation confirment le fait que cette technique facilite la translocation nucléaire de l'ADN plasmidique dans les cellules qui prolifèrent peu. En effet, selon les données du constructeur, le Microporator crée à la fois des pores dans la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire.

4. Relation efficacité versus quantité d'ADN

Nous avons ensuite voulu déterminer la relation entre efficacité de transfection et quantité d'ADN plasmidique (figure 10).

Le pourcentage de cellules GFP positives et la moyenne de fluorescence ont été mesurés, en augmentant graduellement les quantités d'ADN de 10 ng à 2 μ g / 10^5 cellules par électroporation et par les liposomes BSV10/DOPE, GLB43/DOPE et MM18/Chol.

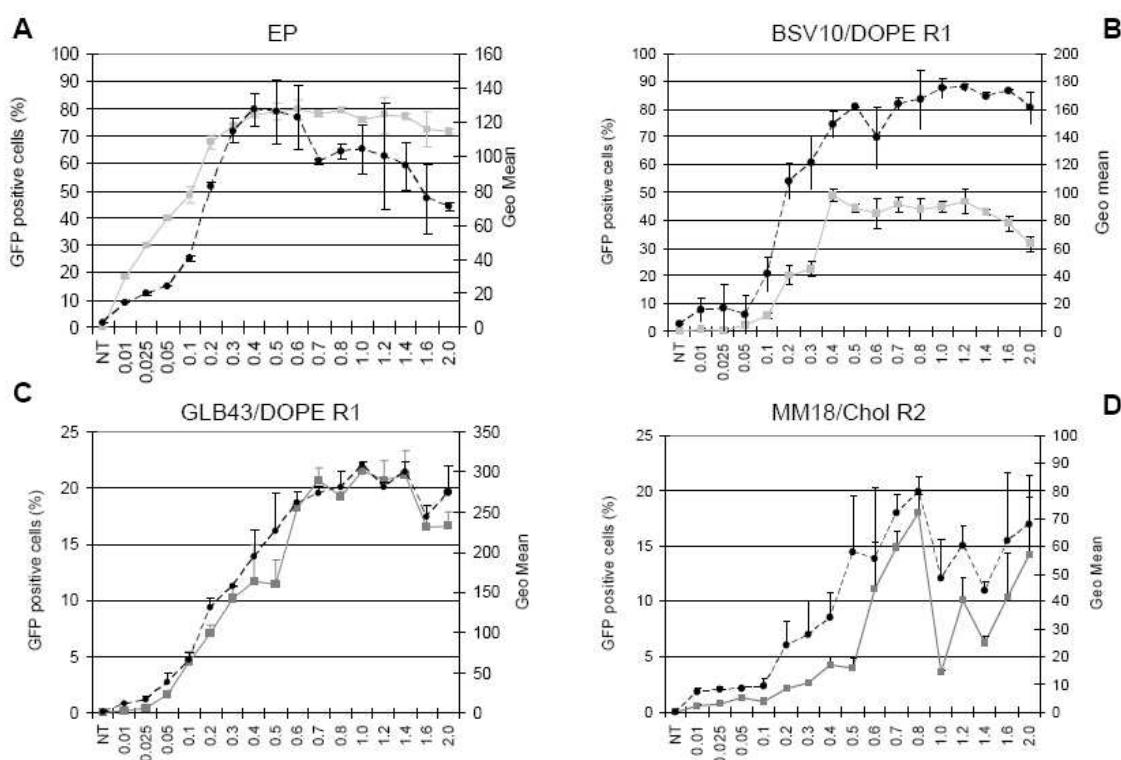


Figure 10. Relations entre quantités d'ADN et efficacités de transfection.

Le pourcentage de cellules HepaRG progénitrices GFP positives selon la transfection par électroporation (EP, A) ou avec les formulations BSV10/DOPE (B), GLB43/DOPE (C) et MM18/Chol (D) en augmentant les quantités (de 10 ng à 2 μ g) de vecteur d'expression pEGFPC3 pour 10^5 cellules. Les résultats des trois expériences indépendantes sont exprimés en pourcentage de cellules GFP positives (caractères gris avec des carrés) comparés aux cellules non transfectées contrôles (NT) et selon le pic de fluorescence (Geo mean) de la population GFP positive (caractères noirs avec des cercles pleins).

Pour l'électroporation, la plus petite quantité d'ADN (10 ng) conduit à ~20% de cellules GFP positives. Ce pourcentage augmente jusqu'à 0,2 µg pour atteindre ~70% de cellules exprimant la GFP. Pour 0,3 à 0,6 µg d'ADN, l'efficacité maximale a été atteinte (~85%), tandis que les plus grandes quantités jusqu'à 2 µg d'ADN voient les efficacités décroître lentement. La moyenne de fluorescence n'est pas corrélée au pourcentage de cellules GFP positives pour de petites quantités d'ADN mais augmente de façon abrupte pour atteindre les plus fortes intensités de fluorescence pour 0,3 à 0,6 µg d'ADN.

Pour les liposomes BSV10/DOPE, GLB43/DOPE et MM18/Chol, les efficacités optimales de transfection ont été obtenues pour 0,4, 1 et 0,8 µg d'ADN respectivement, et la moyenne de fluorescence était en corrélation avec le pourcentage de cellules GFP positives. L'expression de la GFP restait très basse (<5%) jusqu'à 0,1 µg d'ADN et n'était pas proportionnelle à la quantité d'ADN tandis qu'entre 0,1 et 0,4 (± 0,2) µg d'ADN, le pourcentage était linéaire.

Au total, ces études ont permis de définir les conditions optimales de lipofection et d'électroporation des cellules HepaRG progénitrices et différenciées, qui sont résumées dans le tableau de la figure 11.

Techniques (pour 10⁵ cellules)	HepaRG progénitrices	HepaRG différenciées
Liposomes SynNanoVec : Cellules adhérentes	0,4 µg ADN BSV10/DOPE R1	Faible efficacité Forte toxicité
Electroporation : Cellules en suspension	0,3 – 0,6 µg ADN 1500 V 20 ms 1 pulse	0,3 – 0,6 µg ADN 1500 V 20 ms 1 pulse

Figure 11. Conditions de lipofection et d'électroporation des cellules HepaRG.

5. Relation efficacité de transfection versus quantité de plasmide intracellulaire

La question était alors de savoir si le pourcentage de cellules GFP + était corrélé à la quantité de plasmides intracellulaires. Les pourcentages de cellules HepaRG progénitrices transfectées avec pEGFPC3 codant la GFP étaient comparés au ratio de fluorescence entre les cellules transfectées avec les plasmides PC3 non codants marqués à la rhodamine (figure 12).

Pour établir la fluorescence de base, les cellules HepaRG ont été transfectées par le même plasmide pC3 non marqué. Ces expériences de transfection ont été réalisées en utilisant l'électroporation et les formulations BSV10-DOPE, GLB43-DOPE et MM18-Cholestérol qui donnaient des efficacités de transfection très différentes, variant de 80% à 5%.

La transfection par électroporation ou par liposomes BSV10/DOPE qui atteignait respectivement 80% et 50% de cellules GFP positives est caractérisée par de faibles ratios de fluorescence de 3,5 et 4,5, objectivant une charge intracellulaire en plasmide relativement faible. En revanche, les liposomes GLB43/DOPE et MM18/Chol, qui permettent seulement 15 et 5% d'expression GFP, montraient des rapports de fluorescence élevés de 8 et 12. La visualisation in situ des plasmides pC3 marqués FITC a confirmé que les cellules transfectées par les liposomes MM18/Chol émettaient des signaux de fluorescence plus intenses que les cellules électroporées. Ces données ont confirmé que l'amélioration du transport nucléocytoplasmique des plasmides dans le transfert de gènes non viral est le paramètre clé pour obtenir une expression élevée du transgène.

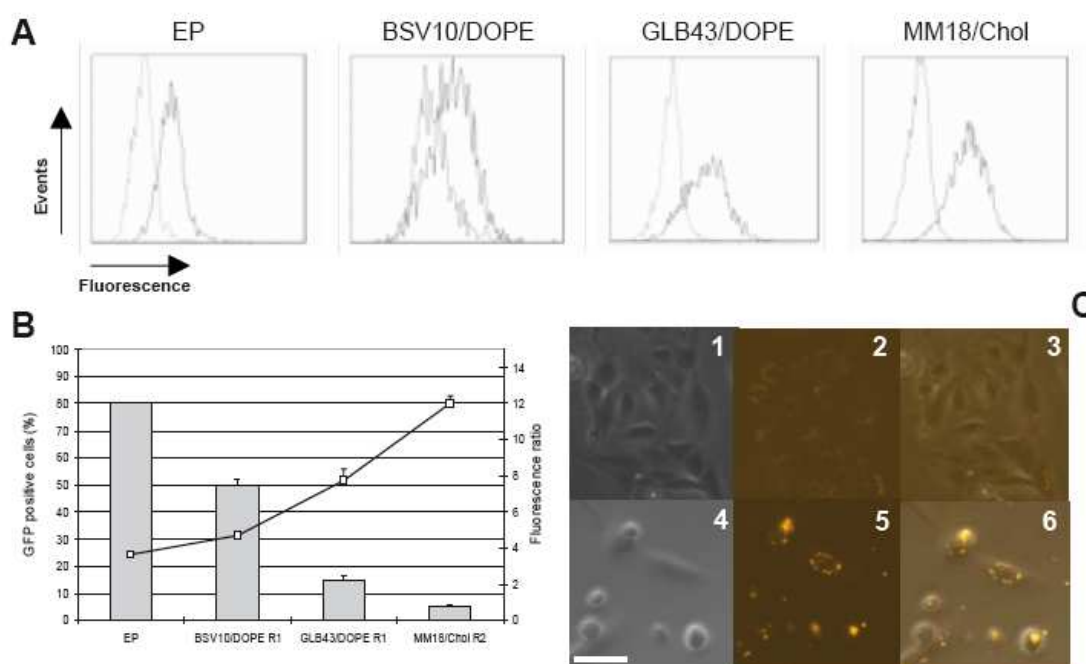


Figure 12. Corrélation entre quantité de plasmides et expression GFP.

Le vecteur pC3 a été marqué en utilisant le kit LabelIT CyTM3 (Mirus, Madison, WI, USA) pour la détection in situ par microscopie à fluorescence (microscope fluorescent Zeiss et logiciel AxioVision LE Rel. 4.3) et le kit Fluorescein LabelIT (FITC) pour la quantification du taux intracellulaire de plasmides par cytométrie en flux en utilisant le canal FL1. Les cellules HepaRG progénitrices ont été transfectées par électroporation (EP) et par les liposomes BSV10/DOPE, GLB43/DOPE et MM18/Chol avec 0,5 µg de plasmide pC3 non marqué ou marqué FITC pour 10⁵ cellules et les plasmides intracellulaires marqués FITC ont été détectés par cytométrie en flux (A, B). Le témoin de fluorescence a été mesuré pour chaque protocole de transfection en utilisant le plasmide pC3 non marqué (courbe de fluorescence de gauche, figure A) tandis que dans les cellules transfectées avec les plasmides marqués FITC, le signal de fluorescence était décalé à droite. Pour chaque protocole, 10⁴ cellules (événements) ont été détectées. Les ratios entre la moyenne de fluorescence obtenue avec les plasmides marqués ou non FITC ont été calculés et comparés, reportés sur la figure B (courbe avec les cercles vides) et comparés aux pourcentages de cellules GFP positives obtenus par transfection avec le plasmide pEGFPc3 (histogrammes). La détection in situ des plasmides pC3 marqués à la rhodamine par microscopie à fluorescence est présentée figure C pour l'électroporation (1 à 3) et pour les liposomes MM18/Chol (4 à 6). Les photographies 1 et 4: contraste de phase, 2 et 5: détection des plasmides marqués à la rhodamine, 3 et 6: superposition. Barre blanche : 15 µm.

6. Surexpression du CYP2E1 dans les cellules HepaRG

L'optimisation de la transfection dans les cellules HepaRG a permis d'envisager la surexpression transitoire du CYP2E1 (figure 3). L'ADNc CYP2E1 (procuré par le Dr. De Waziers, INSERM U775, Université Paris Descartes, France) a été amplifié par PCR avec les primers ATGTCTGCCCTCGGAGTCACC (sens) et TCATGAGCGGGGAATGACACA (antisens) et inséré dans le pcDNA3.1/V5-His-Topo. Les cellules HepaRG progénitrices et différenciées ont été transfectées avec le pEGFPc3 ou le vecteur codant le CYP2E1 humain CYP2E1 par électroporation (figure 13A) et par les lipides BSV10 et KLN47 (13C). Pour l'immunoblotting de la GFP (anticorps: T-19, sc5384, Santa Cruz Biotechnology), du CYP3A4 (antibody: AB1254, Chemicon), du CYP2E1 (antibody: Oxford Biomedical, USA) et du HSC70 (antibody: B-6, sc7298, Santa Cruz Biotechnology), les cellules HepaRG étaient lysées dans une solution d'HEPES 50 mM pH 7.9, NaCl 150 mM, EDTA 0.1 mM, 10% glycérol, 0,5% Tween 20 supplémentée en inhibiteurs de protéases (EDTAfree, Roche). Des protéines totales, 10 µg ont été séparés par électrophorèse sur du 12,5% SDS-PAGE (NewPage, Invitrogen), transférés sur membrane de nitrocellulose et immunoblottés.

Comme attendu, dans les cellules transfectées par le vecteur GFP, les CYP2E1 et CYP3A4 étaient indétectables dans les cellules progénitrices alors que les cellules HepaRG différenciées de type hépatocytaire exprimaient des niveaux élevés de CYP3A4 et de

faibles quantités de CYP2E1 (figure 13A). En revanche, les cellules progénitrices et différenciées électroporées avec le vecteur CYP2E1 exprimaient de hauts niveaux de cette enzyme, tandis que le niveau de CYP3A4 dans les cellules différenciées n'était pas affecté par l'électroporation du vecteur CYP2E1 (figure 13A). De façon intéressante, les plus hauts niveaux d'expression de GFP et de CYP2E1 étaient observés dans les cellules de type hépatocytaire, bien que les pourcentages de cellules GFP positives soient très similaires dans les deux types de cellules (figure 9). Cela pourrait être dû à une forte synthèse protéique dans les cellules différenciées par rapport aux progénitrices. Le niveau d'expression CYP2E1 dans les cellules transfectées est corrélé à une augmentation de ~5 à 6 fois de l'activité enzymatique spécifique de CYP2E1 comparé à l'activité dans les cellules contrôles (figure 13B).

L'expression des protéines GFP et CYP2E1 a également été montrée dans les cellules progénitrices transfectées par les liposomes BSV10/DOPE et à un moindre niveau par le lipide KLN47 (figure 13C). Cependant, dans les cellules différenciées, il n'a pas été observé d'augmentation significative d'expression de CYP2E1 suite à la transfection avec ces lipides, tandis que la GFP a été détectée à de faibles niveaux (figure 13C). Ces données ont démontré que l'électroporation permettait d'obtenir une surexpression du CYP2E1 humain dans les cellules différenciées HepaRG qui permet d'accroître significativement le niveau d'activité de cette isoforme de CYP P450. Cette enzyme du métabolisme des drogues est d'une importance majeure aux niveaux toxicologique et carcinogénique du fait de son implication dans le métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques tels l'éthanol, le paracétamol, l'acrylamide et beaucoup d'agents cancérogènes. Ainsi, un faible niveau d'expression du CYP2E1 dans les cellules HepaRG différenciées représentait jusqu'alors une limitation dans leur utilisation pour les études du métabolisme et de toxicité d'un grand nombre de molécules relevantes en santé humaine. Les cellules HepaRG différenciées exprimant des niveaux élevés des plus importants CYPs, incluant désormais le CYP2E1, ouvrent de nouvelles perspectives pour les études du métabolisme des drogues et de toxicité d'une variété de nouveaux xénobiotiques.

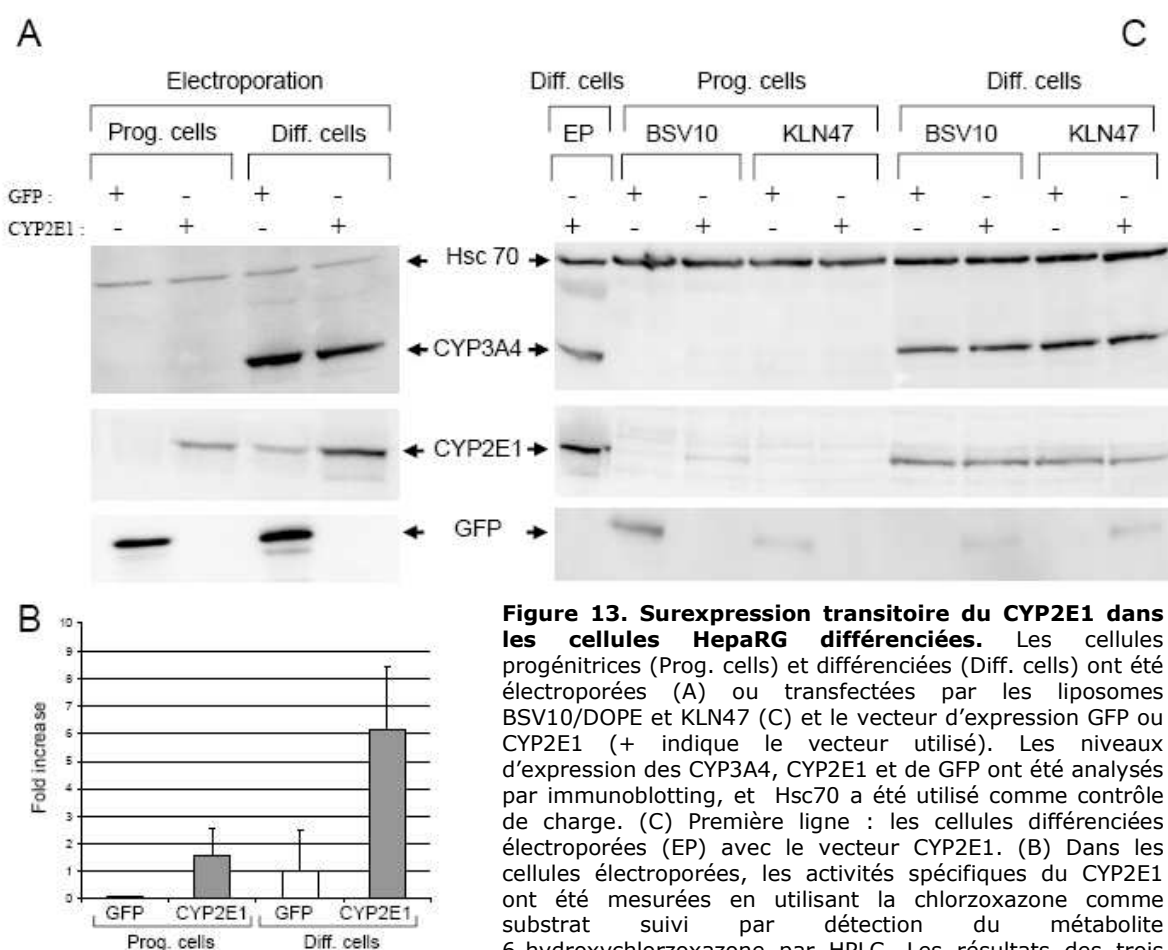


Figure 13. Surexpression transitoire du CYP2E1 dans les cellules HepaRG différenciées. Les cellules progénitrices (Prog. cells) et différenciées (Diff. cells) ont été électroporées (A) ou transfectées par les liposomes BSV10/DOPE et KLN47 (C) et le vecteur d'expression GFP ou CYP2E1 (+ indique le vecteur utilisé). Les niveaux d'expression des CYP3A4, CYP2E1 et de GFP ont été analysés par immunoblotting, et Hsc70 a été utilisé comme contrôle de charge. (C) Première ligne : les cellules différenciées électroporées (EP) avec le vecteur CYP2E1. (B) Dans les cellules électroporées, les activités spécifiques du CYP2E1 ont été mesurées en utilisant la chlorzoxazone comme substrat suivi par détection du métabolite 6-hydroxychlorzoxazone par HPLC. Les résultats des trois expériences indépendantes sont exprimés en taux d'induction de l'activité enzymatique du CYP2E1 arbitrairement égale à 1 dans la condition des cellules HepaRG différenciées transfectées par le vecteur GFP.

L'expression du CYP2E1 augmentée dans les HepaRG différenciées permet d'envisager de nouvelles perspectives pharmaco-toxicologiques, mais la surexpression reste modérée. L'équipe du Dr de Waziers a démontré chez le rat la dégradation du messenger du CYP2E1 sous l'effet de l'insuline en identifiant dans la séquence codante du CYP2E1 tout de même un motif nucléique d'environ 20 pb (141-161) qui régule la demi-vie du messenger sous l'effet de l'insuline au travers de la fixation sur ce messenger d'une protéine qui, à notre connaissance, reste à identifier (Moncion et al, 2002; Truong et al, 2005).

Afin de vérifier si l'expression du CYP2E1 issue du vecteur d'expression était également régulée par l'insuline, nous avons utilisé notre méthode d'électroporation pour transfecter le CYP2E1 dans les cellules HepaRG progénitrices et différenciées. Après transfection, les cellules ont été cultivées en présence ou en absence d'insuline et l'expression des CYP3A4, 2E1 a été étudiée en parallèle de la GFP et du HSC70, respectivement utilisés comme témoin de transfection et comme contrôle de charge (figure 14).

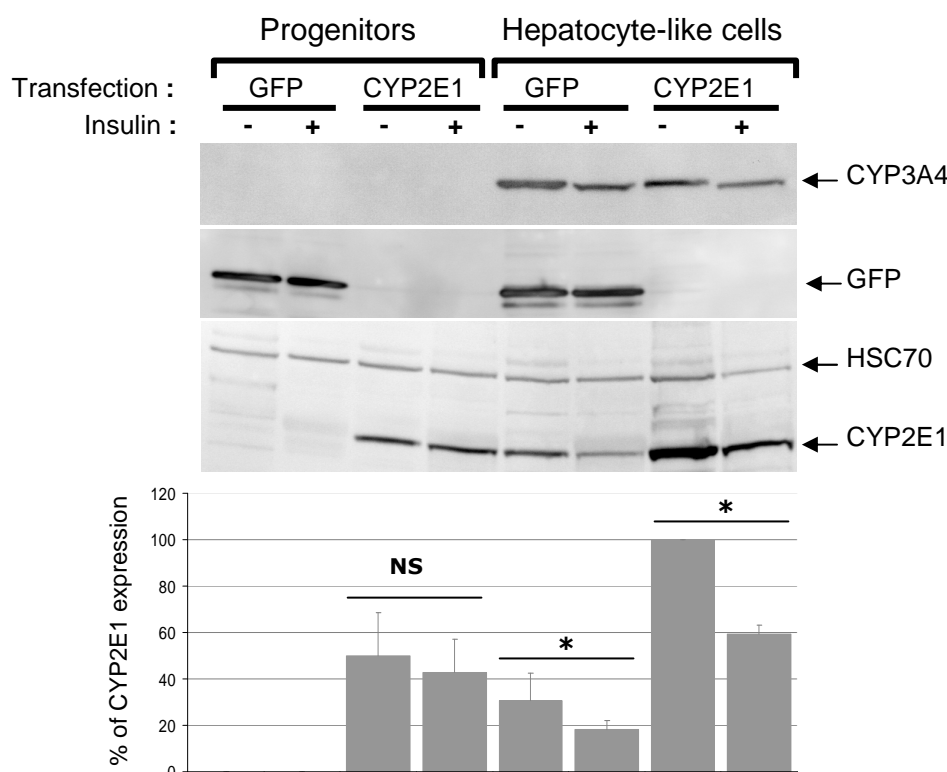


Figure 14. Surexpression transitoire du CYP2E1 et de la GFP dans les cellules HepaRG progénitrices et différenciées. Les cellules progénitrices et différenciées ont été électroporées par le vecteur CYP2E1 ou GFP. Les cellules ont ensuite été cultivées en absence (-) ou en présence (+) d'insuline. Les niveaux d'expression des CYP3A4 et CYP2E1 ont été analysés par Western-blot par rapport à la GFP et au HSC70, utilisé comme contrôle de charge. Test statistique de Mann-Whitney ($p < 0,5$) : Progéniteurs surexprimant CYP2E1 ou GFP avec ou sans insuline : la différence d'expression du CYP2E1 est non significative (NS). Hépatocytes différenciés surexprimant GFP : l'expression du CYP2E1 est significativement supérieure sans insuline (*). Hépatocytes différenciés surexprimant CYP2E1 : l'expression du CYP2E1 est significativement supérieure sans insuline (*).

La protéine HSC70 est présente de façon pratiquement équivalente dans toutes les conditions de transfection. L'expression du CYP3A4 est retrouvée dans les cellules différenciées, comme attendu. L'expression de la GFP est détectée dans les cellules progénitrices et différenciées transfectées et ce, en présence et en absence d'insuline. L'insuline n'a pas d'effet sur l'expression du CYP3A4, de l'HSC70 et de la GFP.

Dans les progénitrices, l'expression du CYP2E1 est due uniquement à la transfection du vecteur d'expression et il n'y a pas de régulation par l'insuline.

L'expression du CYP2E1 recherchée dans les cellules transfectées par le vecteur GFP correspond à l'expression du CYP2E1 endogène. Dans les cellules progénitrices, le CYP2E1 est indétectable, tandis qu'il est présent en faibles quantités dans les cellules différenciées à hauteur de 30% en absence d'insuline et moins de 20% en présence d'insuline dans le milieu de culture. Ces résultats confirment la régulation négative de l'expression du CYP2E1 endogène par l'insuline.

Dans les cellules différenciées transfectées par le vecteur CYP2E1, l'expression détectée reflète l'expression du CYP2E1 endogène et issu de la transcription à partir du plasmide transfecté. Dans les cellules différenciées transfectées par le vecteur CYP2E1, les taux d'expression des CYP2E1 endogène et exogène sont supérieurs à ceux du CYP2E1 endogène, avec ou sans insuline.

Les cellules progénitrices expriment moins de protéines CYP2E1 par rapport aux cellules différenciées, confirmant les résultats de la figure 13, probablement car elles synthétisent moins de protéines en général. D'autre part, là encore, l'expression du CYP2E1 est très augmentée dans les cellules en absence d'insuline (de 42 à 50% pour les progénitrices et de 60 à 100% pour les différenciées).

III. Discussion et perspectives

Les nombreuses mises au point techniques ont permis de définir un protocole de vectorisation non virale par des méthodes chimiques (lipofection) et physiques (microporation) dans les cellules HepaRG en culture et de mettre en évidence les limitations du transfert de gènes, en particulier le franchissement de l'enveloppe nucléaire. Sans cette étape, la transcription, qui est essentiellement nucléaire, ne peut avoir lieu or elle constitue l'étape indispensable pour la traduction très majoritairement cytosolique.

Les lipides synthétisés par la plate-forme SynNanovect ont augmenté considérablement, voire doublé, le niveau d'expression du gène transfecté sans cytotoxicité notable, expliqué par une meilleure libération des endosomes. Cependant, nos résultats peuvent difficilement être comparés à ceux des autres équipes utilisant ces lipides, car les mesures d'efficacité diffèrent. Notre équipe a choisi de mesurer le pourcentage de cellules exprimant le gène transfecté par cytométrie en flux, tandis que beaucoup d'équipes optent pour la mesure de luminescence du gène rapporteur luciférase (pLuc) par un luminomètre. A l'avenir, les expériences pourraient être menées en parallèle avec le plasmide pLuc pour avoir un outil de comparaison.

L'électroporation s'adresse aux cellules en suspension tandis que la lipofection aux cellules adhérentes, c'est pourquoi, ces deux outils ont été développés pour répondre aux différents objectifs de l'équipe. Toutefois, l'électroporation requiert une mise en suspension par la trypsine ce qui modifie la physiologie, le cycle cellulaire et affecte l'équilibre prolifération/différenciation des cellules, c'est pourquoi la lipofection présente toujours un intérêt majeur.

La différence d'efficacité entre les deux techniques s'explique par le fait que l'électroporation crée des pores dans la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire ce qui facilite l'entrée du transgène dans le noyau. De plus, l'ADN n'est pas complexé à une structure lipidique multicouche qui limite la diffusion cytoplasmique des vecteurs plasmidiques. L'électroporation est donc indépendante du cycle cellulaire, contrairement à la lipofection améliorée lorsqu'elle survient pendant la mitose (Brunner et al, 2000). L'équipe de D. Scherman avait démontré que la mitose est indispensable à la translocation nucléaire pour la lipofection sur des cellules HeLa synchronisées (Escriu et al, 2001). Les liposomes pourraient également affecter la prolifération car il y a une baisse de prolifération après transfection.

Les paramètres physico-chimiques des liposomes et des lipoplexes n'ont pas mis en évidence de corrélation claire avec l'efficacité de transfection mais le potentiel Zeta suggère que l'ADN est adsorbé à la surface du liposome BSV10-DOPE lequel donne la meilleure efficacité de transfection. Le colipide, fusogénique, permet au lipoplexe d'être mieux capté par la cellule. Les mesures de taille démontrent souvent le rôle de compaction du liposome par le colipide. Ces paramètres pourraient être complétés par des mesures aux rayons X pour déterminer la phase (lamellaire ou hexagonale) des complexes. Tous les liposomes n'étant pas complexés à l'ADN, des mesures d'HPTLC sur les liposomes et les lipoplexes correspondants pourraient déterminer le pourcentage de liposomes complexés en lipoplexes par rapport aux liposomes totaux ainsi que la composition en lipides et colipides des lipoplexes par rapport aux liposomes.

La détection intracellulaire du plasmide marqué a démontré que la charge en plasmides était inversement proportionnelle au niveau d'expression du gène dans des conditions de transfection sélectionnées. Ainsi, une importante charge intracellulaire en plasmide n'est pas synonyme de grande efficacité d'expression du gène d'intérêt. Ces résultats indiquent que le franchissement de la membrane plasmique n'est pas le facteur limitant de l'expression du gène d'intérêt alors que la translocation nucléaire de ce vecteur est un paramètre essentiel et limitant.

Cependant, des lipides comme le MM18-Cholestérol, faisant entrer 4 fois plus de plasmides pour exprimer 10 fois moins de protéines et permettant une grande accumulation du nombre de plasmides, pourraient être utilisés pour véhiculer des peptides thérapeutiques ayant leur cible dans le cytosol. Qu'il s'agisse d'ADN nu ou d'ADN complexé à un liposome, il est observé une accumulation périnucléaire dans les endosomes ou les lysosomes de l'ADN.

L'application de la transfection transitoire des cellules HepaRG différenciées est la surexpression du CYP2E1. Les expériences ont confirmé la présence d'une régulation post-transcriptionnelle du CYP2E1 par l'insuline dans les cellules différenciées, démontrée par l'équipe du Dr de Waziers dans les cellules différenciées de la lignée cellulaire Fao d'hépatome de rat (De Waziers et al, 1995), dans la lignée cellulaire d'hépatome de rat H4IIEC3 (Moncion et al, 2002) et chez le rat (Truong et al, 2005). La séquence codante du CYP2E1 possède un motif nucléique qui régule la demi-vie du messager sous l'effet de l'insuline. Cependant, nos expériences préliminaires indiquent que la régulation de l'expression du CYP2E1 issue de la transcription du vecteur d'expression semble insensible à l'insuline dans les progéniteurs. Ceci pose la question du contexte de prolifération et/ou différenciation dans la régulation du CYP2E1 par l'insuline.

La transfection transitoire est plus simple et rapide que la transfection stable dans les cellules HepaRG, car il faut plusieurs semaines ou mois pour obtenir un clone stable. Cependant, l'obtention d'une lignée recombinante HepaRG exprimant de façon stable un niveau élevé de CYP2E1 dans les cellules HepaRG constituerait un outil précieux pour les études de pharmacotoxicologie.

Pour l'obtention d'une telle lignée, il sera nécessaire de transfecter et sélectionner des cellules HepaRG progénitrices, dans le but final d'exprimer le CYP2E1 dans un contexte de différenciation complet, c'est-à-dire en utilisant des cellules HepaRG différenciées. Pour ces étapes, la présence d'insuline sera nécessaire pour la prolifération et la différenciation hépatocytaires. La régulation négative du CYP2E1 par l'insuline pourrait constituer un handicap. C'est pourquoi, nous envisageons de produire un ADNc codant le CYP2E1 qui perdrait sa régulation négative par l'insuline.

Les mutations ponctuelles silencieuses du 3^{ème} nucléotide de chaque codon de cette séquence insuline-dépendante, donnant par définition le même acide aminé, pourraient permettre la production d'un vecteur d'expression CYP2E1 insuline-résistant.

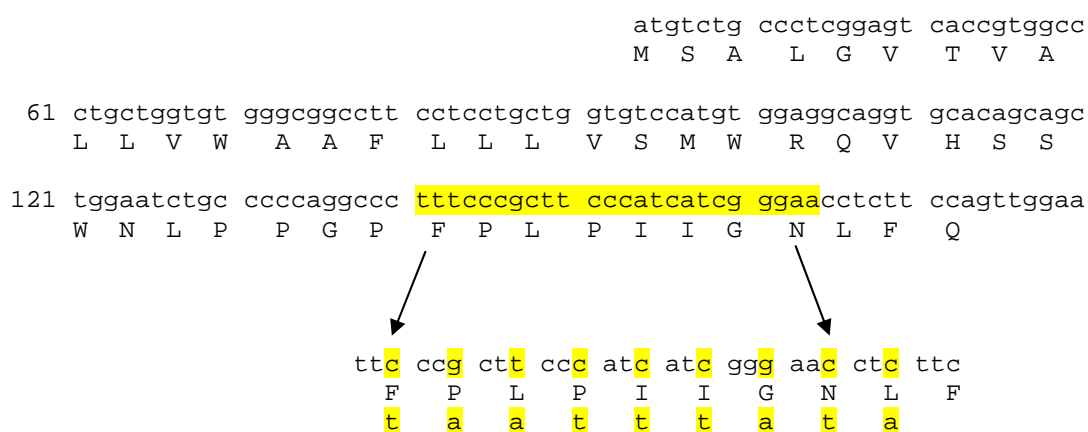


Figure 15. Séquence partielle (1-180 pb) du messager du CYP2E1 insuline-dépendant.

L'objectif est d'obtenir à la fois un clone stable insuline-résistant (muté) cultivé en présence d'insuline et un clone stable sauvage régulé par l'insuline. Cette mutation est déterminante car l'insuline est essentielle dans le milieu de culture pour la prolifération cellulaire mais aussi pour la production de CYP.

Un clone stable au lieu d'une transfection transitoire se justifie par l'effet délétère d'une forte expression de CYP2E1 et par le souhait d'une grande production de CYP2E1 pour mener des études de toxicité et du métabolisme des drogues prises en charge par le CYP2E1.

Par ailleurs, si cet ARNm muté n'est plus régulé par l'insuline, nous confirmerons le schéma de régulation établi par le Dr de Waziers.

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à D. Glaise pour la culture des cellules HepaRG, aux Dr. C. Chesné et G. Ribault (Biopredic Int.) pour la mesure de l'activité du CYP2E1, Dr. L. Lemiègre pour l'aide apportée lors de la synthèse du lipide MM18 et Dr F. Desmots pour l'aide à la conception des figures. La cytométrie en flux a été réalisée avec l'aide de l'Institut Fédératif de Recherche de Rennes (IFR140). V.L. a reçu le financement de l'association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaëtan Saleün (EFS, Brest) et de la Ligue Contre le Cancer. A.F. a reçu le financement du Ministère de la Recherche et de la Technologie. Ce travail a été financé par l'INSERM, l'Institut Fédératif de Recherche de Rennes (IFR140), la Région Bretagne (PRIR Vect-Synth), le GIS-IBiSA et le programme FP7 de la Commission Européenne "LIV-ES" (HEALTH-F5-2008-223317).

Partie B.

Répression de l'expression du récepteur aux amines aromatiques hétérocycliques (AhR) dans les cellules HepaRG différenciées

Article 2.

Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines

Julie Dumont^{a,b,1}, Rozenn Jossé^{a,b}, Carine Lambert^{a,b}, Sébastien Anthérieu^{a,b}, Véronique Laurent^{a,b}, Pascal Loyer^{a,b}, André Guillouzo^{a,b}.

^a Inserm U991, F-35043 Rennes cedex, France ;

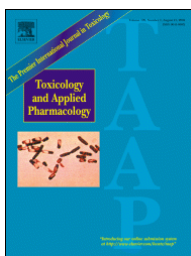
^b Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, F-35043 Rennes cedex, France ;

¹ Adresse actuelle : Inserm UMR 744 - Université Lille Nord de France - Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1, rue du professeur Calmette, F-59019 Lille cedex, France.

Corresponding author:

Pr. André Guillouzo

Inserm U991, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, F-35043 Rennes Cedex, France. Phone: +33 223234791, Fax: +33 223235385, Email address: Andre.Guillouzo@univ-rennes1.fr



Toxicology and Applied Pharmacology, 2010.

I. Introduction

Le 2-Amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (**PhIP**) et le 2-amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline (**MeIQx**) sont les deux amines aromatiques hétérocycliques (**HAA**) les plus communes, produites lors de la cuisson de la viande, du poisson et des volailles. Ces deux HAA sont suspectées d'être carcinogènes chez l'Homme et engendrent différents types de tumeurs chez les rongeurs. Afin de mieux comprendre les bases moléculaires de la toxicité liée aux HAA, le transcriptome des cellules humaines HepaRG métaboliquement compétentes a été analysé en utilisant des puces à ADN pangénomiques, après une exposition unique ou des traitements répétés pendant 28 jours au PhIP et au MeIQx. Les gènes répondant le plus au PhIP et au MeIQx font partie de la famille des gènes aryl hydrocarbon (Ah) : CYP1A1 et CYP1A2 dans les deux conditions de traitements ainsi que CYP1B1 et ALDH3A4 après 28 jours. Pour confirmer cette observation, l'induction des CYP1A1/1A2 dans les cellules HepaRG traitées par HAA, a été bloquée en ciblant le récepteur AhR, par répression de son expression au moyen d'une inhibition chimique ou par interférence (siRNA). De plus, il avait été montré que les HAA induisaient l'activité du promoteur du CYP1A1, qui contient un élément de réponse aux xénobiotiques (XRE). Nous avons également identifié des modulations d'expression de gènes sans lien direct avec des gènes cibles du récepteur AhR. Ces changements concernent les gènes principalement liés à la croissance cellulaire et la prolifération, l'apoptose, et le cancer. En conclusion, ces résultats ont identifié un panel de gènes ciblés préférentiellement par le PhIP et le MeIQx dans les cellules HepaRG et soutiennent l'hypothèse que le risque de cancer chez l'Homme peut spécifiquement être dû à la consommation de HAA dans l'alimentation. L'article figure en annexe 9.

II. Résultats

1. Contexte général de l'étude

Les résultats présentés dans cette partie sont regroupés dans un manuscrit qui sera soumis prochainement pour publication. Ce chapitre ne présentera que les résultats obtenus concernant la mise au point des protocoles d'électroporation des cellules HepaRG, par des siARN utilisés ici pour réprimer l'expression du récepteur AhR.

2. Electroporation de siARN

A la suite de la mise au point du protocole d'électroporation permettant une bonne efficacité d'expression de gènes d'intérêt tel que le CYP2E1, nous avons voulu évaluer ces conditions d'électroporation dans la perspectives de transfecter des siARN pour cette fois réprimer des gènes exprimés dans les cellules HepaRG.

Pour identifier des conditions efficaces de transfection de siARN, nous avons utilisé un siARN couplé à la Rhodamine. Ce siARN est conçu pour réprimer l'expression de la GFP. En absence d'expression de GFP dans les cellules HepaRG, il ne cible donc pas de gènes endogènes. Nous avons dans un premier temps testé 3 conditions de transfection :

- L'électroporation
- Le lipoplexe KLN47 avec un rapport de charge de 2
- Une molécule commerciale, le siPortamine® (Ambion)

Cette dernière s'était révélée particulièrement efficace pour la répression de gènes dans des fibroblastes humains (P. Loyer, données non publiées).

La transfection par ces 3 méthodes de siARN-Rhodamine dans les cellules HepaRG progénitrices permettait de visualiser en microscopie à fluorescence le signal émis au niveau intracellulaire par ces siARN marqués (figure 16).

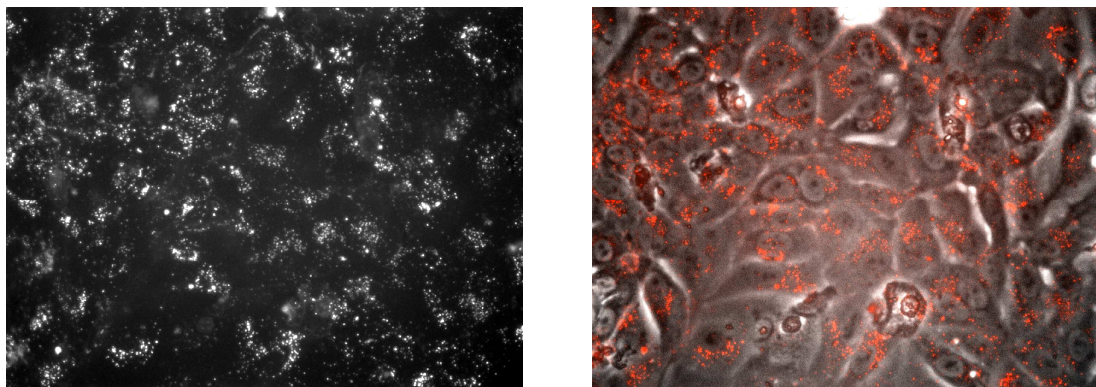


Figure 16. Visualisation des siARN marqués à la Rhodamine en microscopie à fluorescence après transfection par le siPortamine®. À gauche, en noir et blanc, à droite, superposition des cellules en contraste de phase et du marquage intracellulaire Rhodamine (siARN) en couleur rouge.

Les 3 protocoles permettaient des accumulations intracellulaires de siARN très efficaces sans différence quantitative apparente entre les 3 protocoles par cette méthode semi-quantitative d'évaluation (données non montrées).

Pour évaluer la capacité de répression de gènes endogènes par ces protocoles, nous avons participé à l'étude de la répression du récepteur AhR dans les cellules HepaRG différenciées traitées ou non aux amines aromatiques hétérocycliques PhIP et MeIQx. Lors d'expériences préliminaires, nous avons démontré que le siPortamine® ne permettait pas de réprimer efficacement l'expression de l'Ahr dans nos conditions expérimentales (donnée non montrée), alors que l'électroporation permettait une répression très nette. Nous n'avons pas, dans ces expériences préliminaires, réalisé d'étude comparative détaillée incluant le liposome KLN47 ou d'autres molécules issues de la plate-forme SynNanovect. Ce travail devra être effectué afin d'identifier d'autres conditions efficaces de transfection de siARN.

L'expression de l'Ahr a donc été réprimée par ARNi dans les cellules HepaRG différenciées en hépatocytes par électroporation.

3. Le récepteur AhR

Le récepteur Ah (Aryl-Hydrocarbon) est activé par la fixation de ligands tels que les polluants environnementaux (dioxine, substances organiques, benzène...). La voie du AhR active notamment le gène du CYP1A1, une enzyme importante du métabolisme des xénobiotiques.

Cependant, la stimulation du AhR semble aussi influencer sur le déroulement d'événements liés au cycle cellulaire, fournissant une explication alternative de son rôle dans la promotion de cancers, indépendamment du métabolisme des procarcinogènes.

La problématique était de déterminer si AhR est impliqué dans l'induction transcriptionnelle des CYP1A1 et CYP1A2 par les amines aromatiques hétérocycliques PhIP et MeIQx seules ou combinées (P+M).

4. Transfection des siRNA ciblant le récepteur Ah

10^6 cellules HepaRG ont été électroporées avec 100 pmoles de siAhr ou 100 pmoles de contrôle négatif siRNA (Dharmacon, Cat # D-001210-01) en utilisant le Microporator MP-100 (Neon System™, Invitrogen). Les cellules HepaRG ont été électroporées 1 fois à 1500 V pendant 20 ms puisensemencées à la densité de 2×10^5 cellules/cm². Deux

jours après la transfection de siRNA, les cellules HepaRG étaient traitées avec ou sans HAA et 24 h après, le contenu total en ARN des cellules HepaRG était extrait et rétro-transcrit. La répression du récepteur AhR dans les cellules transfectées par siRNA a été étudiée par Western-blot. L'expression des CYP1A1 et 1A2 a été étudiée dans des cellules contrôles et traitées par PhIP ou le MeIQx dans un contexte d'expression ou de répression de AhR. Nos résultats (figure 17) démontrent que le protocole d'électroporation que nous avons proposé permet de réprimer très fortement l'expression de AhR (<20% du contrôle). Cette répression a permis de réaliser l'étude du rôle de AhR dans l'induction des CYP1A1 et 1A2 après traitement par PhIP et MeIQx.

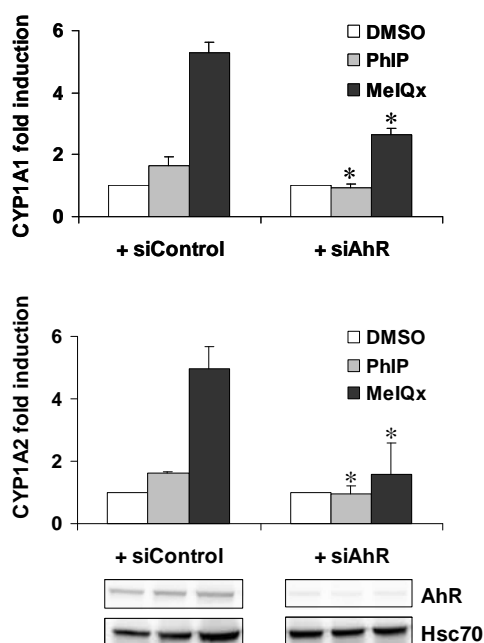


Figure 17. Rôle du récepteur AhR dans l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 induite par les HAA dans les cellules HepaRG.

Les cellules HepaRG transfectées avec un siRNA ciblant spécifiquement Ahr (siAhr) ou avec un siRNA contrôle ne ciblant aucun gène endogène (siControl, utilisé comme contrôle de la transfection des siRNA), étaient exposées à 10µM de PhIP ou 10µM de MeIQx, pendant 24 h. Les niveaux d'ARNm des CYP1A2 et CYP1A1 ont été estimés par RT-qPCR. L'efficacité de la répression de l'Ahr a été validée en niveaux protéiques par Western-blot.

Les données représentent les moyennes et écarts-types de trois expériences indépendantes. Tous les résultats étaient exprimés par rapport aux niveaux trouvés avec les cellules contrôles, arbitrairement égaux à 1. * $p < 0.05$ comparé aux cellules contrôles respectives.

Les CYP1A1 et 1A2 ne sont pas induits quand l'expression du récepteur AhR est inhibée, comme le montrent les résultats quantitatifs d'induction des messagers des CYP1A1 et 1A2.

5. Transfection des vecteurs d'expression

Pour démontrer que l'induction du CYP1A1 par les amines aromatiques hétérocycliques était liée à une induction transcriptionnelle, les cellules HepaRG différenciées ont été transfectées par électroporation d'une construction plasmidique incluant le gène rapporteur luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un fragment du promoteur du gène CYP1A1 (-1 à -1566 pb). En parallèle, une construction similaire sous le contrôle transcriptionnel de 3 motifs XRE (Xenobiotic Response Element) a également été utilisée.

Les cellules HepaRG sont électroporées par le Microporator MP-100 (Neon System™, Invitrogen) toujours dans les conditions optimales que nous avons préalablement définies. 10^5 cellules HepaRG étaient mises en suspension dans 10 µl de tampon de microporation (Invitrogen) en présence de 500 ng de constructions pCYP1A1-FL(-1566) ou pGL3-XRE3 et 50 ng de vecteurs pRL-SV40. Les cellules HepaRG ont été électroporées 1 fois à 1500 V pendant 20 ms puisensemencées à la densité de 2×10^5 cellules/cm². Après 24 h, les cellules étaient exposées aux HAA pendant 24 h. Les activités luciférases des vecteurs Firefly (pGL3-vector) et Renilla (pRL-vector) ont été mesurées (figure 18).

Après transfection, les cellules ont été traitées par PhIP et MeIQx puis l'activité luciférase a été comparée aux deux contrôles : **DMSO**, solvant des molécules PhIP et MeIQx et **3MC**, un inducteur connu du CYP1A1.

Pour les 2 constructions, le traitement par le 3MC induit une forte induction transcriptionnelle. Le traitement par PhIP et MeIQx induit également une induction transcriptionnelle significative du promoteur CYP1A1 (-1566) mais dans une proportion beaucoup plus faible, et seul le MeIQx augmente significativement l'activité transcriptionnelle dépendante du XRE.

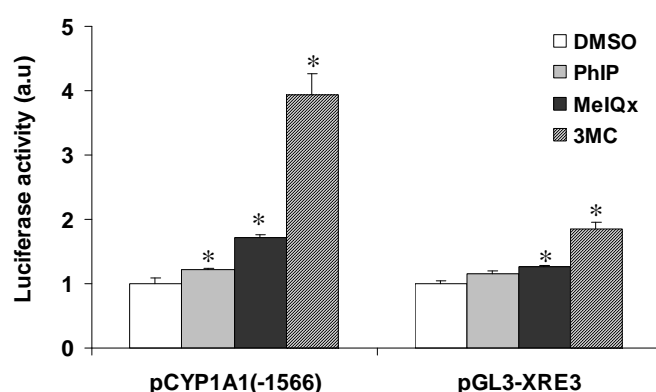


Figure 18. Effet du PhIP et du MeIQx sur l'activité du promoteur CYP1A1 dans les cellules HepaRG en transfection transitoire.

L'activité luciférase a été évaluée dans les cellules HepaRG transfectées transitoirement avec les constructions luciférase pCYP1A1(-1566) et pGL3-XRE3. 24 h après transfection, les cellules HepaRG étaient maintenues en conditions contrôles (DMSO) ou traitées par 10 μ M de HAA. 3-MC (0.5 μ M) a été utilisé comme contrôle positif. L'activité luciférase a été normalisée par rapport à l'expression du plasmide co-transfecté qui exprimait la luciférase *Renilla*. Les données représentent les moyennes et écarts-types de quatre expériences indépendantes. Tous les résultats étaient exprimés par rapport aux niveaux trouvés dans les cellules contrôles, arbitrairement égaux à 1. * $p < 0.05$ comparé aux cellules contrôles respectives.

Au total, ces résultats indiquent que le récepteur AhR intervient dans l'induction du CYP1A1 en réponse au traitement par PhIP et MeIQx et que cette induction présente au moins une composante transcriptionnelle même si l'on ne peut exclure un autre mécanisme. Enfin, les amines aromatiques hétérocycliques PhIP et MeIQx induisent une augmentation du CYP1A1 qui reste modeste en comparaison de celle générée par le 3MC.

Résultats 2.

Production d'une protéine recombinante sécrétée, l'hépcidine

I. Introduction

Outre l'expression du cytochrome P450 2E1 et la répression du gène AhR, une autre application de mes travaux de thèse a été la production par les cellules HepaRG d'une protéine recombinante sécrétée appelée hepcidine dans le cadre d'une collaboration avec L. Détivaud et O. Loréal (INSERM U991).

L'hepcidine joue un rôle inhibiteur sur l'absorption intestinale du fer et/ou sur l'augmentation de son relargage à partir de macrophages (Nicolas & Vaulont, 2005).

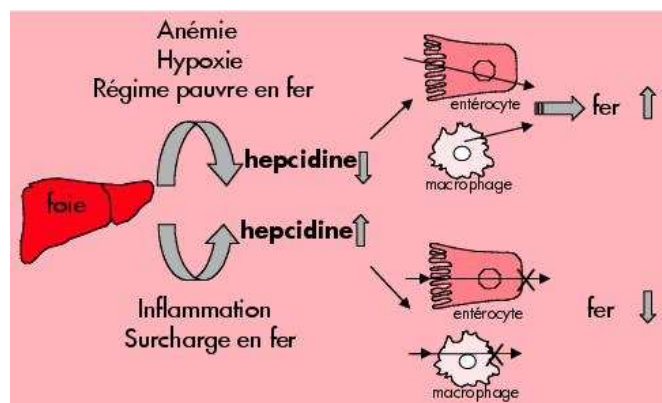


Figure 1. Régulations possibles de la synthèse de l'hepcidine en réponse à différentes situations physiologiques associées à des désordres du métabolisme du fer (Beaumont, 2003).

L'hepcidine est une hormone sécrétée par le foie qui régule l'homéostasie du fer au niveau de l'absorption intestinale et de son stockage hépatique (figure 1). Historiquement, elle a été découverte par ses propriétés anti-bactériennes. Les anomalies d'expression de cette hormone sont impliquées dans le développement de l'hémochromatose (Pigeon et al, 2001). L'inactivation du gène codant l'hepcidine entraîne une surcharge en fer. L'hepcidine maintient l'homéostasie du fer, en inhibant la ferroportine, une protéine qui transporte et régule le stockage du fer dans les cellules (Beaumont, 2003; Nicolas & Vaulont, 2005).

Malgré la présence du gène de l'hepcidine apparemment fonctionnel, il n'a pas été retrouvé à ce jour, dans les cellules HepaRG de messagers ni de protéine hepcidine. Le peptide de synthèse hepcidine n'ayant pas d'activité biologique, le transfert d'un vecteur d'expression dans les cellules HepaRG est une option possible pour la production d'une protéine recombinante, car sa synthèse et sa maturation sont complexes et nécessaires pour obtenir une activité biologique.

Les cellules HepaRG sont donc de bons candidats pour :

- Etablir une sécrétion d'hepcidine et analyser le métabolisme du fer dans ces cellules qui sont très proches du point de vue fonctionnel des hépatocytes
- Transfecter les cellules HepaRG pour tester la possibilité de produire une lignée dérivée, localiser l'hepcidine et établir les conditions de sélection d'une lignée recombinante stable basées sur la sélection par antibiotiques et le suivi des cellules positives pour la GFP par cytométrie en flux.
- Tester la possibilité de produire à grande échelle la production d'hepcidine recombinante fonctionnelle (active).
- Analyser l'impact de mutations ponctuelles du gène de l'hepcidine sur sa synthèse et sa sécrétion.

II. Résultats

Dans une première étape d'étude de faisabilité, nous avons choisi de réaliser la surexpression d'une protéine de fusion hepcidine-GFP. La construction plasmidique consistait en un plasmide pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) dans lequel nous avons inséré le cDNA hepcidine-GFP (figure 2).

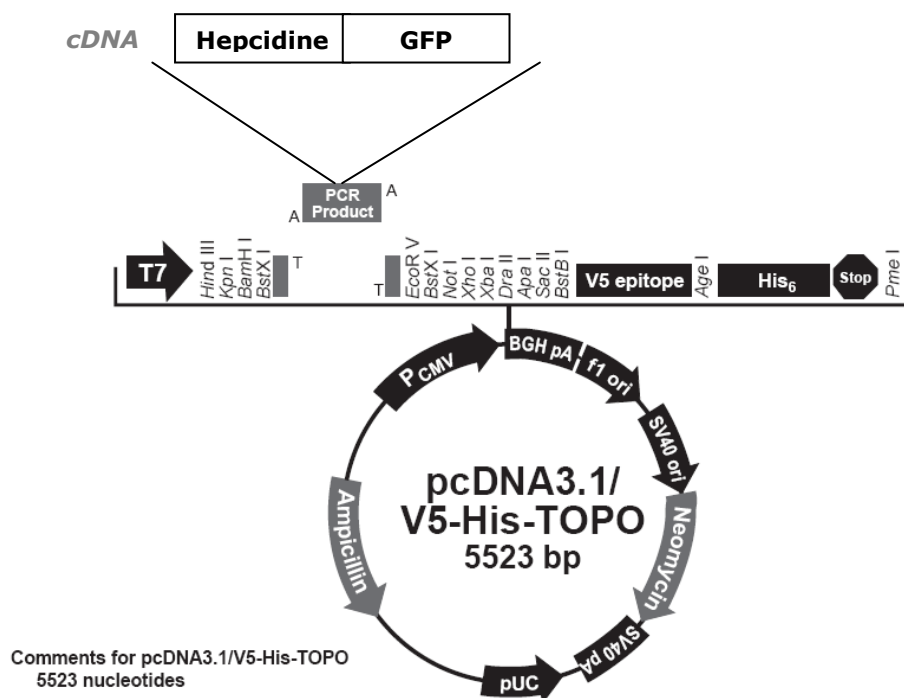


Figure 2. Vecteur d'expression pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) dans lequel est inséré le cDNA hepcidine-GFP.

Cette stratégie avait les objectifs suivants :

- Etablir la faisabilité de l'obtention d'une lignée recombinante stable après électroporation de cellules HepaRG
- Déterminer le pourcentage de cellules positives pour l'expression du gène d'intérêt par le suivi de l'expression de la GFP
- Vérifier si la protéine de fusion hepcidine mature-GFP pouvait être sécrétée.

Les cellules HepaRG progénitrices ont été électroporées avec un vecteur d'expression codant la protéine de fusion hepcidine-GFP, afin d'obtenir un clone cellulaire stable. A cette fin, l'antibiotique G418 est ajouté après 48h et laissé plusieurs semaines. Une population résistante a été obtenue mais seulement 25% des cellules exprimaient la protéine de fusion hepcidine-GFP (figure 3, 1^{ère} ligne).

Outre la sélection par l'antibiotique G418, la sélection des cellules d'après le suivi des cellules positives pour la GFP, par tri cellulaire en cytométrie de flux est indispensable pour ce type de cellules pour l'établissement d'une lignée stable. Avant tri, c'est-à-dire par la seule sélection au G148, uniquement 25% des cellules expriment l'hepcidine-GFP (figure 3, 1^{ère} ligne).

Un premier tri cellulaire par cytométrie en flux a permis d'isoler les cellules GFP+ (95%). A l'issue de chaque étape de tri, une population positive à au moins 95% était remise en culture toujours en présence de G418. Un mois plus tard, l'analyse en cytométrie indiquait que seulement 50% des cellules étaient toujours positives pour la GFP (figure 3, 2^{ème} ligne), démontrant que le caractère de stabilité n'était pas encore acquis. Un second tri permettait de réensemencer plus de 95% de cellules positives entretenues pendant 4 mois sous une forte concentration de G418 (400 µg/mL). A l'issue de ces 4 mois, 90% des cellules étaient toujours positives pour l'expression de la GFP (figure 3, 3^{ème} ligne) indiquant qu'une stabilité d'expression de la GFP était atteinte. Avec l'objectif d'isoler une population cellulaire la plus homogène possible, un troisième tri a permis d'isoler plus de 95% de cellules GFP+ (figure 3, 4^{ème} ligne) dont la stabilité d'expression du transgène s'est confirmée au cours des mois (données non montrées).

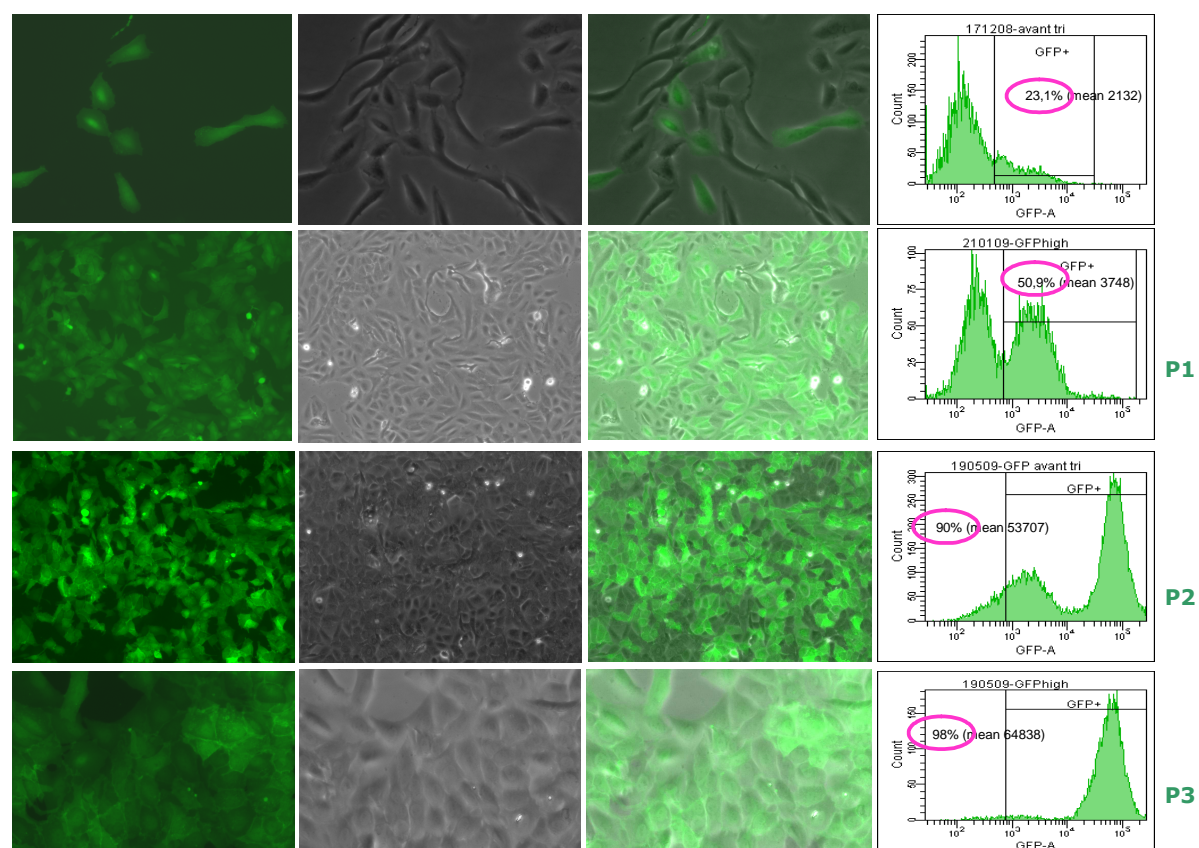


Figure 3. Photographies des cellules électroporées et sélectionnées par l'antibiotique G418 et par sélection des cellules GFP+ cytométrie en flux. Les photographies de gauche à droite reflètent les cellules GFP+ prises en microscopie à fluorescence, en contraste de phase et en superposition. Les analyses de cytométrie figurent à droite et indiquent le pourcentage de cellules GFP positives. P : passage en cytométrie.

L'ensemble de ces étapes de sélection par le G418 et tri cellulaire a été réalisé sur des cellules HepaRG progénitrices. A ce stade, il était primordial de vérifier si les cellules HepaRG Hepcidine-GFP gardaient leur potentiel de différenciation. Les cellules issues du second tri ont été mises en culture pour induire la différenciation la plus poussée possible en présence de 2% de DMSO. Nous avons confirmé que ces cellules avaient gardé leur potentiel bipotent puisque l'on observait clairement 2 populations très distinctes morphologiquement et caractéristiques des hépatocytes et des cellules cholangiocytaires (Figure 4, 1^{ère} ligne).

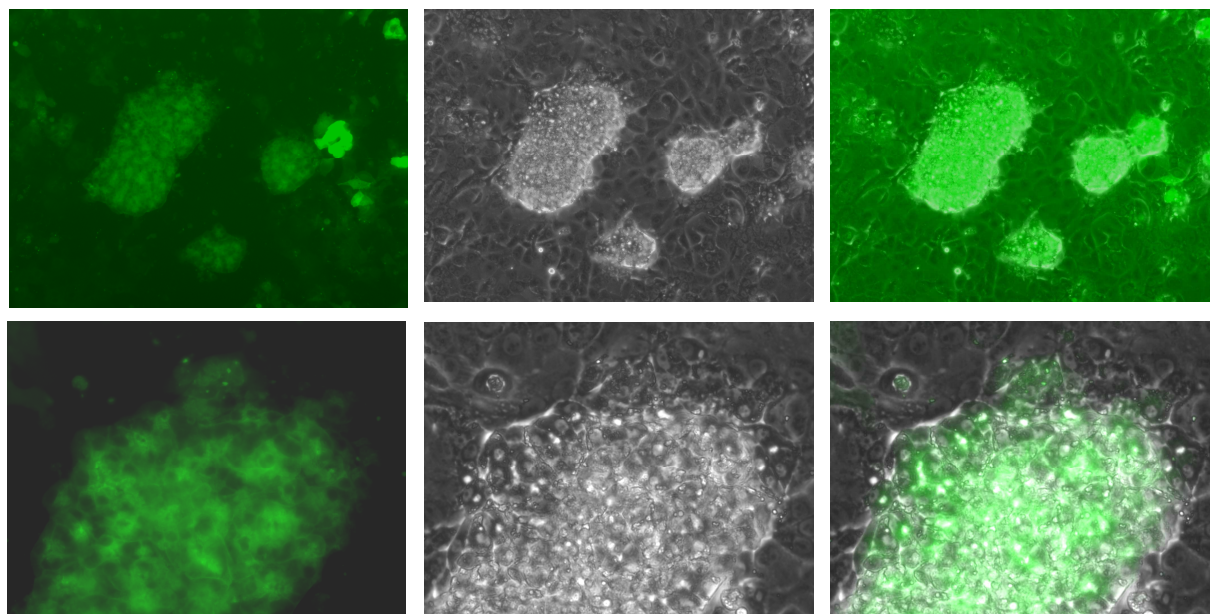


Figure 4. Photographies à faible (haut, 1^{ère} ligne) et fort (bas, 2^{ème} ligne) grossissements des cellules HepaRG différenciées exprimant la protéine hepcidine-GFP. Vues en microscopie à fluorescence, contraste de phase et superposition, de gauche à droite.

L'expression de la protéine hepcidine-GFP semble localisée à la membrane plasmique et aux canalicules biliaires des hépatocytes, ce qui suggère une sécrétion des protéines plasmatiques par le pôle biliaire des hépatocytes HepaRG. Le pôle de sécrétion de l'hepcidine reste à confirmer ainsi que la localisation de l'hepcidine par microscopie confocale et apotome.

Cependant, nous avons observé que l'expression de la GFP était considérablement plus élevée dans les colonies hépatocytaires que dans les plages de cellules biliaires (figure 4, 1^{ère} ligne) alors que la fluorescence de la population de cellules progénitrices est relativement homogène.

Deux hypothèses peuvent être proposées :

- Les biliaires perdent leur capacité d'expression de l'hepcidine-GFP cependant le vecteur d'expression comporte un promoteur fort pCMV
- Les hépatocytes expriment fortement la protéine de fusion en raison de leur capacité de synthèse protéique.

Pour vérifier ces hypothèses, nous réaliserons des expériences complémentaires en utilisant la population la plus homogène issue du troisième tri. Nous comparerons l'évolution de l'intensité de fluorescence avant, pendant et après différenciation entre progéniteurs, hépatocytes et cellules biliaires. En parallèle, une analyse de l'expression des transcrits Hepcidine-GFP devrait permettre de compléter l'information quant à une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de l'expression du transgène.

L'observation à plus fort grossissement des cultures HepaRG Hepcidine-GFP(+) différenciées semble suggérer une localisation partiellement membranaire (figure 4, 2^{ème} ligne) de la protéine de fusion en accord avec le fait que l'hepcidine subisse une maturation qui implique une étape membranaire avant sa sécrétion (voir paragraphe suivant). De plus, il semble que la protéine de fusion soit également accumulée au niveau des néocanalicules biliaires présents dans les colonies hépatocytaires. Ceci devra cependant être confirmé par des expériences de colocalisation avec des protéines du canalicule en microscopie confocale. Cependant, ces résultats suggèrent une sécrétion

des protéines plasmatiques par le pôle biliaire des cellules HepaRG hépatocytaires. Nous nous sommes alors intéressés à la détection de la protéine Hecidine-GFP par Western-blot.

La maturation de l'hepcidine en protéine sécrétée nécessite plusieurs étapes (figure 5) :

- L'hepcidine est traduite sous forme d'un pré-pro-peptide composé de 3 parties, de 24, 35 et 25 acides aminés.
- Un clivage dans le réticulum endoplasmique (RE) aboutit à deux parties, le peptide signal et le propeptide
- Un site de clivage situé à la membrane plasmique permet d'aboutir à la forme sécrétée active constituée des 25 derniers acides aminés.



Figure 5. Etapes de la maturation de l'hepcidine.

La protéine de fusion hepcidine-GFP que nous avons générée peut donc revêtir plusieurs formes (figure 6) :

- Une protéine GFP en fusion avec le prépropeptide ou le pro peptide retrouvée dans les cellules
- Une protéine GFP en fusion avec la forme sécrétée dans le milieu.

Protéine hepcidine-GFP

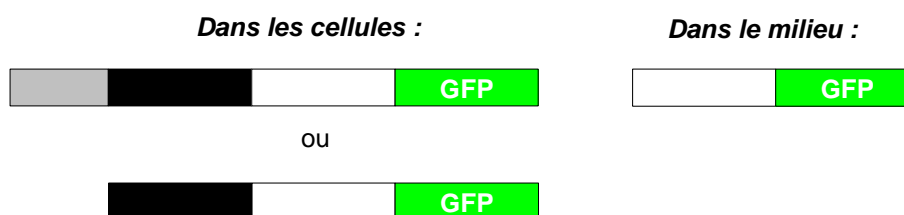


Figure 6. Formes possibles de la protéine de fusion hepcidine-GFP.

L'expression de la protéine hepcidine-GFP a pu être détectée par Western-blot dans les culots cellulaires et les milieux de culture avec un anticorps anti-GFP (figure 7) :

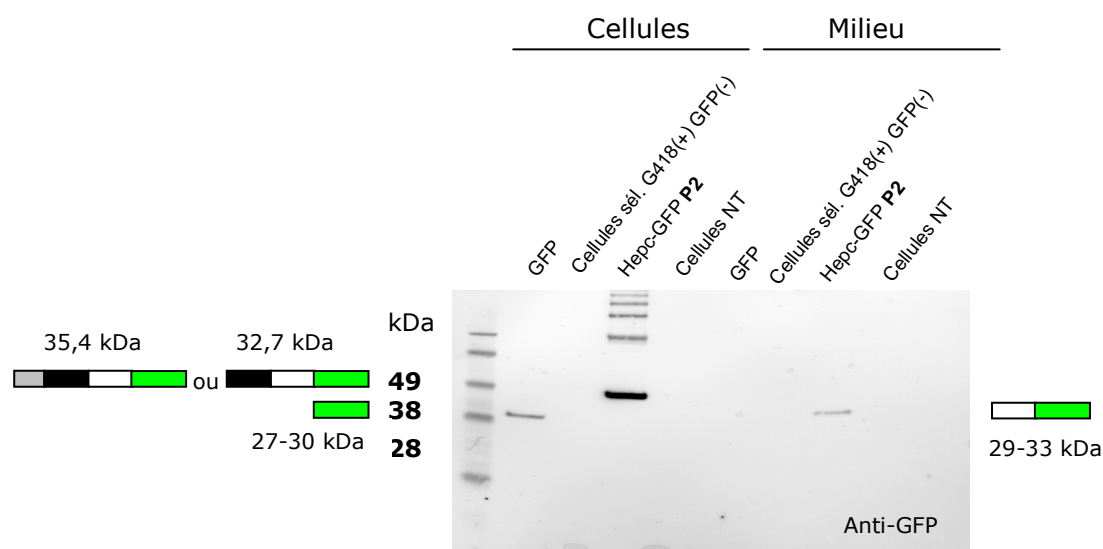


Figure 7. Détection de la protéine de fusion hepcidine-GFP par Western-blot avec un anticorps anti-GFP dans les cellules HepaRG et le milieu. Les cellules transfectées par le vecteur GFP sont des contrôles de la transfection et de migration de la GFP seule. Cellules sél. G418(+)/GFP(-) : Cellules sélectionnées après le 2^{ème} tri (100% GFP-). Hepc-GFP P2 : Cellules après le 2^{ème} tri (90% GFP+). Cellules NT : Cellules non transfectées.

Les cellules étaient soit :

- Témoins, non transfectées (Cellules NT)
- Transfectées par le vecteur d'expression codant la GFP seule (protéine intracellulaire GFP)
- Résistantes au G418 et négatives pour la GFP (Cellules sélectionnées G418+GFP-)
- Transfectées par le vecteur codant l'hepcidine-GFP après le 2^{ème} tri contenant 90% de cellules positives pour la GFP (Hepc-GFP P2)

Une forte expression de la protéine hepcidine-GFP après le 2^{ème} tri cellulaire est obtenue dans les cellules et le milieu, confirmant la production de protéines hepcidine-GFP matures sécrétées dans le milieu. En revanche, dans les cellules, il est dans ce document impossible de conclure concernant les deux formes détectées.

Par ailleurs, la présence des bandes multiples d'hepcidine de haut poids moléculaire visibles sur le Western-blot pourrait être due à des agrégats et/ou à de la poly-ubiquitination.

III. Discussion et perspectives

Cette étude pilote nous a permis de montrer que la seule sélection par un gène de résistance à un antibiotique, dans ce cas le G418, ne suffisait pas pour la sélection et l'isolement d'une population exprimant de façon homogène le gène d'intérêt malgré l'émergence d'une population résistante à des concentrations élevées de drogue.

Deux hypothèses peuvent être avancées :

- 1- Des cellules HepaRG progénitrices acquièrent spontanément et rapidement une résistance, ou
- 2- Les cellules résitantes ont effectivement intégré le transgène qui a subi des remaniements permettant de conserver la résistance au G418 tout en perdant l'expression de la fusion Hepcidine-GFP.

Pour obtenir une population exprimant de façon stable et homogène la protéine d'intérêt Hepcidine-GFP, nous avons tiré partie de l'expression de la GFP qui permet un tri cellulaire en cytométrie. Cette stratégie a en effet permis d'isoler une population cellulaire exprimant de façon homogène la GFP. Nous n'avons pas pour l'instant vérifié que les cellules de cette même population expriment toutes l'hepcidine.

Cependant, la détection de la protéine Hepcidine-GFP est très nette par Western-blot suggérant qu'une majorité de cellules expriment effectivement la fusion hepcidine-GFP.

Initialement, nous doutions que la protéine de fusion hepcidine-GFP (+) puisse être sécrétée. En effet, le peptide mature hepcidine ne comprend que les derniers 25 acides aminés du prépropeptide en fusion par sa partie C-Terminale avec la GFP, une protéine d'environ 30 kDa soit 5 à 10 fois la masse moléculaire de l'hepcidine mature. Pourtant, nous avons bien détecté une forme protéique réagissant avec l'anticorps GFP et qui présente une masse moléculaire apparente supérieure à la GFP laissant supposer qu'il s'agit bien de la fusion hepcidine mature-GFP sécrétée dans le milieu. Il faudra cependant vérifier ceci en réalisant le même Western-blot avec un anticorps anti-hepcidine.

Si la maturation et la sécrétion d'une fusion hepcidine-GFP se confirme alors nous disposons d'un modèle cellulaire qui permettra d'étudier ces processus de maturation et de sécrétion. Il sera possible d'étudier les protéases mises en jeu pour la maturation de cette fusion dans les cellules HepaRG mais aussi d'étudier les mécanismes de sécrétion.

De plus, la question de la fonctionnalité complète de la fusion sécrétée se pose.

La fonctionnalité du peptide hepcidine-GFP pourra être déterminée par un **test fonctionnel** vérifiant ses propriétés antibactériennes et régulatrices du fer. L'idée est d'appliquer le milieu des cellules transfectées par le vecteur d'expression codant l'hepcidine contenant l'hepcidine mature sécrétée sur des cellules transfectées par le vecteur d'expression codant la ferroportine. Le rôle de l'hepcidine sera avéré si une internalisation des récepteurs à la ferroportine (figure 8) suivie par marquage apparaît.

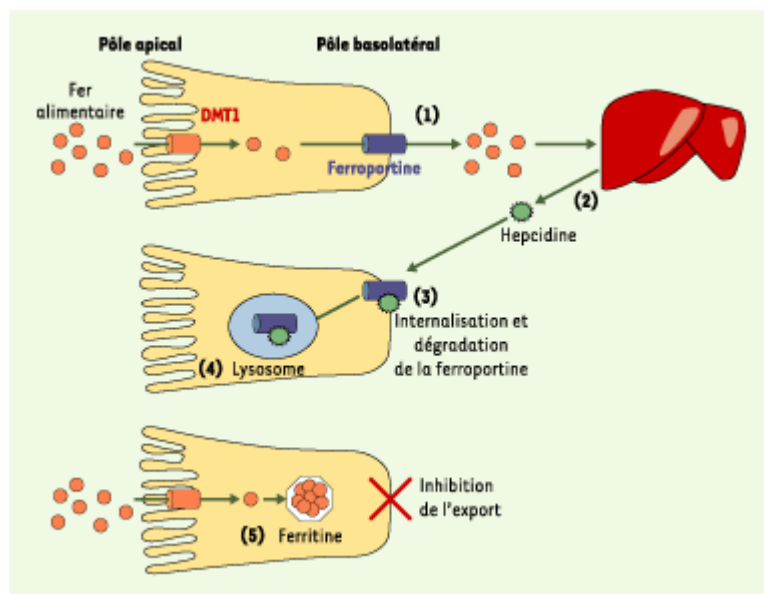


Figure 8. Modèle du mécanisme d'action de l'hépcidine. Après avoir été réduit, le fer alimentaire traverse la membrane apicale de l'entérocyte grâce au transporteur DMT1 puis transite vers la membrane basolatérale qu'il traverse en empruntant la ferroportine tout en étant réoxydé (1). Le fer absorbé en excès est stocké au niveau du foie, provoquant une augmentation de la synthèse et de l'excrétion de l'hépcidine (par un mécanisme qui demeure inconnu) (2). L'hépcidine se lie alors directement sur la ferroportine (3), et induit son internalisation puis sa dégradation dans le lysosome (4). Le fer qui entre dans la cellule s'accumule alors dans la ferritine (5) et n'est plus exporté. Le transport net du fer alimentaire est donc diminué et le pool de fer sera perdu lors de l'exfoliation de l'entérocyte au sommet de la villosité duodénale. Les réserves en fer (notamment hépatiques) sont alors utilisées pour maintenir une érythropoïèse efficace, ce qui, à terme, permet un retour à un état d'équilibre avec une diminution des réserves en fer. Lors d'une inflammation, une production excessive d'hépcidine pourrait aboutir à une dégradation trop importante de la ferroportine, engendrant une absorption insuffisante de fer. Un mécanisme similaire existerait au niveau des macrophages et des cellules du syncytiotrophoblaste, deux cibles tissulaires de l'hépcidine (Nicolas & Vaulont, 2005).

Cette étude de faisabilité a ouvert de nouvelles perspectives. En effet, la lignée HepaRG recombinante stable exprimant constitutivement le gène d'intérêt a pu être obtenue par une double sélection, antibiotique et suivi du marqueur fluorescent pour le cDNA de fusion hépcidine-GFP. La synthèse et la maturation ont pu être vérifiées par la présence de l'hépcidine dans le milieu, cependant, la protéine de fusion peut présenter des différences au niveau fonctionnel, en raison des différences de conformation et de poids. Au lieu d'un peptide de fusion hépcidine-GFP dont le rôle actif peut différer du peptide hépcidine seul, le prochain objectif est d'obtenir l'expression d'un vecteur d'expression codant les 2 ADNc hépcidine et GFP séparés par une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui permettra l'expression des 2 protéines séparées à partir d'un même ARNm.

De même, le test fonctionnel d'internalisation des récepteurs à la ferroportine pourra être effectué, permettant de comparer les résultats entre protéines native et de fusion.

Résultats 3.

Encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules

I. Introduction

L'approche des nanotechnologies et plus particulièrement des nanomédicaments est très prometteuse. De nombreux essais cliniques utilisant des principes actifs anti-cancéreux bien connus comme le cisplatine ou la doxorubicine encapsulés sont en cours (Chuang et al, 2010; Iqbal et al, 2010; Recchia et al, 2010; Wolff et al, 2010). Les premiers résultats de ces essais ont permis d'augmenter l'efficacité de ces médicaments, d'en diminuer la toxicité et les effets secondaires grâce au ciblage des cellules tumorales par un ligand sans affecter les cellules saines, renforçant l'intérêt de leur développement clinique (Costantini, Congrès GTRV, 2006).

En parallèle du transfert de vecteurs d'expression ou de siRNA, cette dernière partie de mon travail de thèse s'est concentrée sur la vectorisation de principes actifs encapsulés dans des nanoparticules dans le cadre d'une collaboration avec l'ENSC Rennes.

En effet, si les méthodes physiques et les méthodes chimiques de type lipofection sont plus couramment utilisées pour véhiculer des gènes, les nanovecteurs de type nanoparticules et nanosphères s'adressent davantage aux principes actifs.

Les nanomédicaments testés dans les essais cliniques actuels utilisent souvent des médicaments anti-cancéreux ayant déjà obtenu leur autorisation de mise sur le marché (AMM) afin de diminuer la durée des essais cliniques par rapport aux nouvelles molécules thérapeutiques. Ces essais étant engagés, nous avons fait le choix de l'innovation en testant une nouvelle famille de nanoparticules encapsulant de la doxorubicine dans le cadre d'une étude de faisabilité.

Le concept d'une administration ciblée des drogues anticancéreuses apparaît particulièrement attractif (Huynh et al, 2009), en l'occurrence une forme d'administration ciblant le foie de type vectorisation moléculaire, permettant de délivrer les principes actifs dans le foie au voisinage de la tumeur (Yamada et al, 2003). Le but de ces travaux consiste en l'utilisation d'une vectorisation hépatotrope, qui puisse améliorer l'efficacité d'un principe actif en augmentant sa biodisponibilité et sa concentration intra-hépatique. Cela permet en outre de réduire la dose administrée et ainsi, de limiter les effets secondaires liés à la dispersion extra-hépatique.

Pour remplir leurs fonctions, ces nanoparticules doivent :

- Etre non toxiques par elles-mêmes
- Permettre une encapsulation efficace des principes actifs
- Cibler le type cellulaire d'intérêt
- Etre suffisamment stables pour atteindre la cible cellulaire
- Etre biodégradables pour libérer le principe actif

II. Approches techniques

ImPACcell (<http://imagerie-puces-a-cellules.univ-rennes1.fr/>) est une station d'analyse multiparamétrique cellulaire par l'image à haut contenu informatif et une station de criblage semi-haut débit, pour repérer, analyser et quantifier un(e)/ou un ensemble de composants ou fonctions cellulaires et évaluer l'action biologique de molécules exogènes, naturelles ou de synthèse, sur différents modèles cellulaires et tissulaires.

Le plateau de screening semi-haut débit de molécules à visée thérapeutique repose sur :

- L'automatisation et la robotisation de la distribution de cellules et de produits dans des dispositifs parallélisés de culture cellulaire (plaques 96 puits, microsystèmes) à l'aide de pipettes multicanaux ou d'un spotter adapté aux microsystèmes et aux microvolumes.
- L'accès à un panel de lignées cellulaires humaines représentatives de différents tissus ou de tumeurs chez l'homme :

PC3 : lignée cellulaire dérivée d'un adénome prostatique (Kaighn et al., 1979)

NCI : lignée cellulaire dérivée d'un cancer du poumon (Gazdar et al., 1980)

Caco : lignée cellulaire dérivée d'un cancer colorectal (Jumarie et Mao., 1991)

HCT116 : lignée cellulaire dérivée d'un cancer colorectal (Brattain et al., 1981) qui se divise beaucoup plus que les cellules de la lignée Caco

MDA : lignée cellulaire dérivée d'un cancer mammaire (Gazdar et al., 1998)

HuH7 : lignée cellulaire dérivée d'un hépatocarcinome (Nakayashi et al., 1982)

Fibroblastes de peau : lignée contrôle car ces cellules se divisent très peu par rapport aux lignées cellulaires cancéreuses et sont moins susceptibles d'être affectées par des agents antiprolifératifs. Un faible effet sur la croissance de ces cellules démontre une absence d'effet cytotoxique immédiat indépendant de la croissance cellulaire.

Le protocole résumé sur la figure 1 permet d'évaluer l'activité proliférative par établissement d'une courbe de croissance cellulaire par comptage de noyaux sur la base de l'ADN coloré au Hoechst, sur une période de 24 et 48 h et de mesurer de l'efficacité bioactive des molécules par l'établissement d'une gamme dose-réponse (IC50) comparative sur les différentes lignées cellulaires.

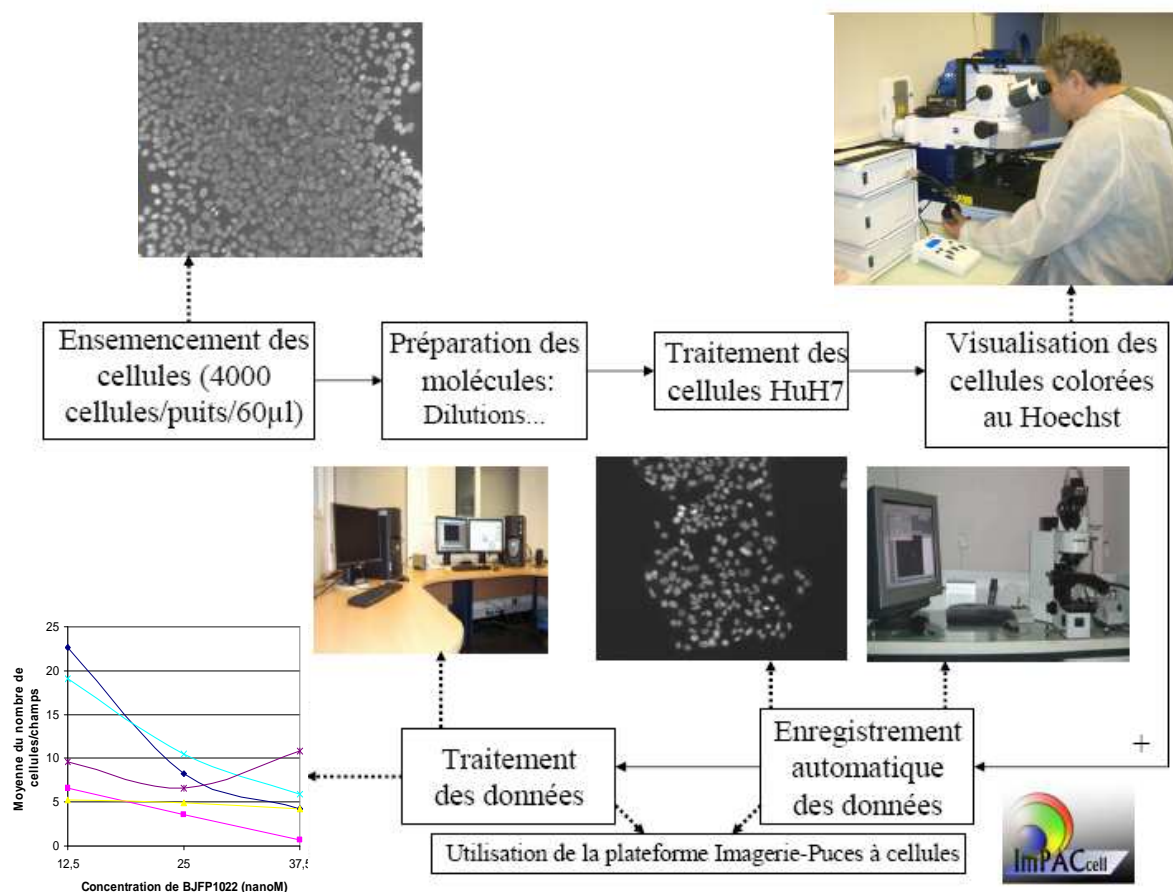


Figure 1. Protocole du screening de molécules d'intérêt utilisé par la plate-forme ImpACcell.

Les cellules sont ensemencées à hauteur de 4000 cellules/puits/60µl et les molécules préparées à différentes dilutions pour traiter les cellules HuH7 dans cet exemple. Les cellules colorées au Hoechst sont visualisées en microscopie. Les données sont enregistrées de façon automatique puis traitées par la plate-forme ImpACcell pour fournir des graphes représentant le nombre de cellules par champ en fonction de la concentration en principe actif, en nanoparticules, en principe actif encapsulé dans des nanoparticules ou additionné aux nanoparticules (IC50). L'IC50 est défini par la concentration d'un composé induisant une diminution de 50% du nombre de cellules.

Plus l'IC50 sera faible, plus la molécule sera anti-proliférative et/ou cytotoxique, car une faible concentration suffit.

III. Résultats

L'objectif était la synthèse de polymères dérivés du poly (acide β malique) optimisés pour la vectorisation de principes actifs anti-tumoraux pour cibler le CHC. Ils sont optimisés par le greffage d'une biotine pour le ciblage et d'une fluorescéine amine (FA) pour la biodistribution. Le principe actif choisi était la doxorubicine pour sa disponibilité en grandes quantités permettant les mesures physico-chimiques mais aussi pour sa détection possible par ultra-violets. Ces critères ont permis de formuler les nanoparticules par nanoprécipitation et de déterminer le taux d'encapsulation de la doxorubicine dans les nanoparticules.

Les objectifs biologiques étaient l'étude de l'absorption cellulaire in vitro sur des lignées cellulaires, de la biodistribution in vivo chez la souris en particulier dans le foie mais aussi de la cytotoxicité des nanoparticules vides ainsi que des principes actifs encapsulés ou non sur des lignées cellulaires, par le comptage des noyaux sur la plate-forme ImpACcell et la mesure des activités caspases (DEVD-AMC).

1. Paramètres physico-chimiques des nanoparticules

Le **poly-acide malique** ou PMLA et ses dérivés, dont la synthèse a été optimisée par S. Cammas-Marion et T. Benvegnu, sont de bons candidats pour des applications biomédicales. En effet, ils sont peu toxiques et dégradables en acide malique dans des conditions physiologiques. L'**acide malique** est un intermédiaire naturel du **cycle de Krebs**. De plus, ils possèdent une fonction acide carboxylique latérale modifiable ouvrant la possibilité de greffages de groupements de ciblage (biotine, acide folique, peptides...) et la synthèse de toute une famille de dérivés. A partir de ce type de polymère, il a déjà été démontré qu'il était possible de formuler des micelles macro-moléculaires et des nanoparticules capables d'encapsuler des drogues anti-cancéreuses (Cammass et al, 1999). Une collaboration entre l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) dont l'un des groupes est spécialisé dans la synthèse de ces polymères (Barbosa et al, 2008) et le laboratoire INSERM U991 a été établie pour évaluer l'intérêt thérapeutique des nanoparticules dérivées de PMLA.

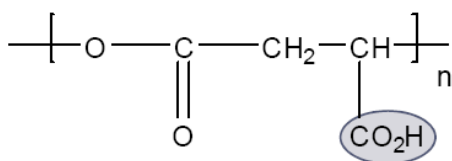


Figure 2. Structure du PMLA modulable grâce à la fonction acide carboxylique latérale.

La formation de ces nanoparticules se fait par **nanoprécipitation**. Cette méthode consiste en l'addition de la solution d'acétone contenant les polymères (qui constitueront les nanoparticules) dans de l'eau sous agitation. Puis l'acétone est évaporée par un évaporateur rotatif. Ainsi, les nanoparticules sont récupérées en suspension dans l'eau.

Quatre nanoparticules à base de PMLA ont été synthétisées :

- PMLA-Be (poly-benzyl-malate)
- PMLA-He (poly-hexyl-malate)
- PMLA-Me (PMLA auquel ont été greffées 42 molécules de **PEG** et du **méthyle** par l'intermédiaire d'un oxygène)
- PMLA-Bio (PMLA auquel ont été greffées de la **biotine** et 62 molécules de **PEG**)

Les caractérisations physico-chimiques ont utilisé la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la RMN pour vérifier la composition chimique, les infra-rouges (IR) pour vérifier

l'étape de la transformation de lactone en polymère, les ultra-violets (UV) pour évaluer le taux d'encapsulation, et la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour la taille.

Nanoparticules	Taille	Potentiel Zeta	Concentration en doxorubicine	Taux d'encapsulation
PMLABe	115 nm	-50 mV	5µg/ml	2%
PMLAHe	110 nm	-72 mV	8µg/ml	3,2%
PMLABe-(PEG)42-OMe	70 nm	-8 mV	104µg/ml	42%
PMLABe-(PEG)62-Biot	80 nm	-6 mV	80µg/ml	32%

Figure 3. Paramètres physico-chimiques des nanoparticules. La concentration en doxorubicine est évaluée pour 2,5 mg/mL de nanoparticules. Le taux d'encapsulation est défini en pourcentage de la quantité de doxorubicine (250 µg/mL) incubée avec les nanoparticules (2,5 mg/mL) lors de la formulation.

La **taille** est comprise entre 70 et 128 nm, qui semble stable pendant plusieurs semaines sauf pour le PMLA-He dont l'augmentation de taille suggère une fusion de particules au cours du temps. Les tailles sont inférieures en présence de PEG confirmant son rôle dans la compaction finale des particules.

Les particules non pegylées présentent un **potentiel Zeta** d'environ -50 à -70 mV alors que les formes pegylées sont beaucoup moins chargées.

2. Encapsulation de la doxorubicine

La **doxorubicine** est un inhibiteur de la topoisomérase II, indiquée dans le cancer du sein, poumon, vessie, ovaire, estomac, dans la maladie de Hodgkin, dans les sarcomes osseux, des lymphomes non Hodgkiniens, des leucémies aigües, des leucémies chroniques, et dans les tumeurs solides chez l'enfant. Elle inhibe la synthèse de l'ARN et de l'ADN en s'intercalant dans leur structure.

D'importantes mises au point ont été réalisées concernant l'encapsulation et la coordination entre le laboratoire de chimie de l'ENSCR et l'Unité INSERM U991 pour le traitement des cellules. De grandes quantités de nanoparticules doivent être préparées, notamment pour vérifier, par des mesures physico-chimiques le taux d'encapsulation du principe actif.

Pour déterminer le taux d'encapsulation, les principes actifs encapsulés sont dégradés et la concentration en doxorubicine est évaluée dans le milieu. Les mesures de l'encapsulation de la doxorubicine sont présentées figure 3.

Le pourcentage d'encapsulation correspond donc à une moyenne de doxorubicine encapsulée. Par exemple, les 42% d'encapsulation signifient que les 2,5 mg/mL de nanoparticules qui ont servi à l'encapsulation ont encapsulé 42% de doxorubicine, incluant des pourcentages variables d'une nanoparticule à une autre. Cela ne signifie pas que 42% des nanoparticules contiennent de la doxorubicine ni que les nanoparticules contiennent 42% de doxorubicine.

Les variations d'encapsulation sont en faveur des nanoparticules pegylées qui encapsulent jusqu'à 24 fois plus de doxorubicine (de 2 à 42%). Le PEG semble améliorer la capture de la doxorubicine et sa compaction des co-polymères à bloc PMLA-PEG du fait de la diminution de la taille. La doxorubicine, adsorbée sur le PEG, se place entre le polymère et le PEG.

Par ailleurs, les nanoparticules vides ne peuvent pas être récupérées car elles ne peuvent techniquement pas être séparées de celles chargées, en raison d'une variation de masse trop faible. En revanche, la doxorubicine non encapsulée peut être récupérée.

3. Tests toxicologiques des nanoparticules vides

Cette étape a consisté en l'évaluation in vitro de la toxicité des nanoparticules dérivées de poly-acide malique sur différentes lignées cellulaires humaines.

La cytotoxicité des molécules a été analysée par la densité cellulaire de lignées cellulaires humaines en utilisant l'infrastructure de la plate-forme ImpACcell. Cette station d'analyse et de criblage permet notamment de caractériser et/ou d'évaluer l'action biologique de molécules cibles sur les cellules en culture. Les tests toxicologiques se sont basés sur le comptage des noyaux (figure 4).

L'évaluation in vitro de la toxicité des nanoparticules a montré que les nanoparticules dérivées de poly-acide malique (PMLA-Be, PMLA-He, PMLA-Me, PMLA-Bio) ne présentent aucune toxicité jusqu'à des valeurs d'environ 3 μM .



Figure 4. Effets sur la densité cellulaire des nanoparticules PMLA. Les cultures des sept lignées ont été traitées par ces composés et la densité cellulaire a été établie par comptage des noyaux pour chaque lignée et aux différents doses de nanoparticules. Colonne de gauche : données brutes des comptages (nombre de cellules par champs) pour les 7 lignées. Colonne de droite : moyennes et écart types du nombre de cellules par champ pour la lignée HuH7 après traitement par les 4 nanoparticules en comparaison des quantités équivalentes d'eau utilisée comme véhicule.

4. Tests toxicologiques des nanoparticules PMLA encapsulant la doxorubicine versus doxorubicine libre

Les cellules de la lignée d'hépatome HuH7 ont été cultivées, traitées et incubées pendant 48h avec des nanoparticules (PMLA-Be, PEG-PMLA-Be et Biotine-PEG-PMLA-Be) vides ou encapsulant la doxorubicine versus la doxorubicine libre. La densité cellulaire a été évaluée sur la plate-forme ImpACcell (figure 5) et l'activité caspases reflétant l'apoptose a été effectuée avec le substrat des caspases DVED-AMC (figure 6).

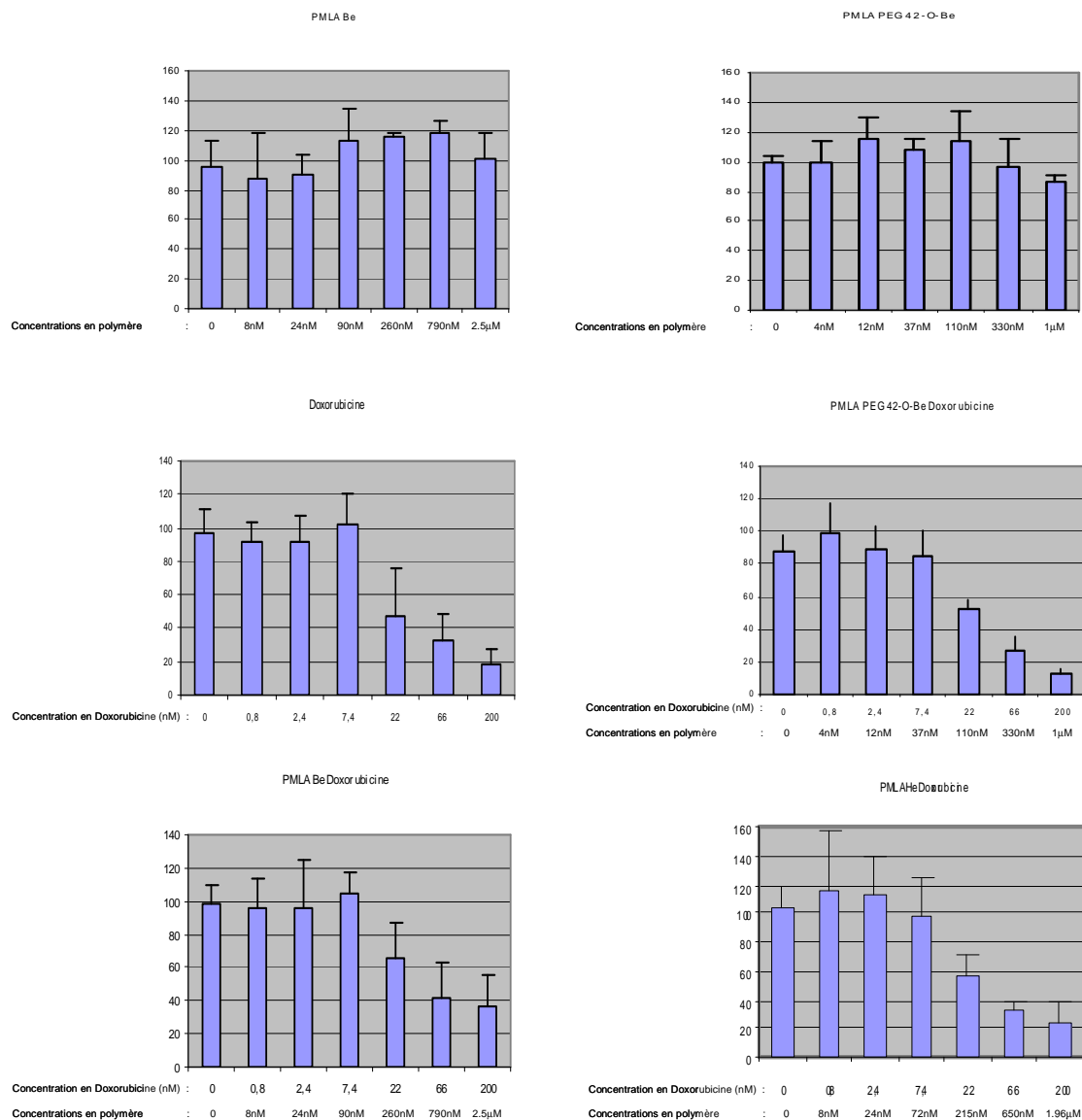


Figure 5. Viabilité cellulaire de la lignée HuH7 en fonction de la concentration en doxorubicine encapsulée ou non dans les nanoparticules. Nombre moyen de cellules par champ en fonction de la concentration de doxorubicine dans le milieu. La doxorubicine est seule dans le milieu ou encapsulée dans les nanoparticules (PMLA-Be). Pour les traitements avec des nanoparticules encapsulant de la doxorubicine, les concentrations en doxorubicine et polymères sont indiquées.

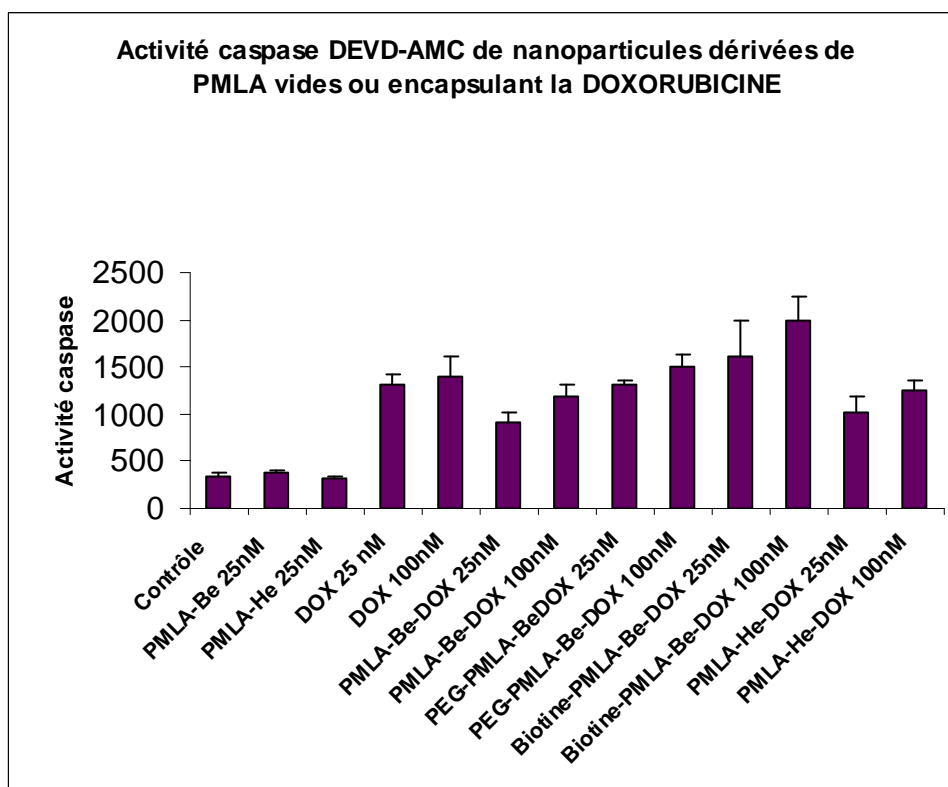


Figure 6. Activités caspases de lysats de cellules HuH7 induites par les nanoparticules (PMLA-Be, PEG-PMLA-Be et Biotine-PEG-PMLA-Be) vides ou encapsulant la doxorubicine versus la doxorubicine libre.

La densité cellulaire tout comme les activités caspases des cellules HuH7 démontrent l'absence de toxicité des nanoparticules vides (PMLA-Be et PMLA-He) et l'induction de l'apoptose par la doxorubicine seule et encapsulée. La cytotoxicité du PEG-PMLA-BeDOX25nM est équivalente à celle de la doxorubicine seule. L'encapsulation n'a pas d'effet sur le niveau de cytotoxicité. Par contre, la même nanoparticule à plus forte concentration (PEG-PMLA-Be-DOX100nM) augmente l'effet cytotoxique de la doxorubicine. La cytotoxicité est encore majorée pour la Biotine-PMLA-Be-DOX25nM et atteint un maximum pour la Biotine-PMLA-Be-DOX100nM. En revanche, pour la PMLA-Be-DOX25nM, PMLA-Be-DOX100nM, la PMLA-He-DOX25nM, PMLA-He-DOX100nM, l'encapsulation diminue l'efficacité de la doxorubicine. L'encapsulation Biotine-PMLA-Be-DOX100nM semble donc être la meilleure formulation.

5. Biodistribution in vivo

Afin d'évaluer la biodistribution de ces nanoparticules chez la souris, nous avons réalisé une première expérience d'injection par la veine de la queue de 200 µg/souris de nanoparticules PMLA couplées à la fluorescéine amine (FA). Des coupes congelées ont été réalisées pour vérifier la présence de nanoparticules fluorescentes au niveau hépatique. En microscopie à fluorescence, sur des coupes de foie de souris sacrifiées 4h après injection, nous n'avons pas été en mesure de visualiser la présence de nanoparticules fluorescentes. De plus, un important bruit de fond rend difficile la lecture des coupes. Cette étape expérimentale pose donc des problèmes techniques et nous ne sommes pas en mesure de conclure que ces nanoparticules pénètrent le parenchyme hépatique.

6. Recherche de nouvelles molécules d'intérêt

Si le pronostic du carcinome hépatocellulaire était jusqu'alors très sombre, depuis 2008, une nouvelle classe de molécules antiprolifératives a, pour la première fois, amélioré la survie des patients atteints de CHC et de tumeurs d'autres origines tissulaires (Abou-Alfa et al, 2006; Llovet et al, 2008). Ces médicaments, dits biologiques, ciblent des molécules régulant les processus cellulaires qui concourent à la survenue ou à la progression du CHC (Llovet & Bruix, 2008). Il s'agit notamment du **sorafénib**, un inhibiteur de tyrosines kinases ciblant les voies Raf/MEK/ERK, VEGFR 2/3 et PDGFR- β , du **sunitinib**, un inhibiteur du récepteur au VEGF impliqué dans l'angiogénèse tumorale, du **bevacizumab**, un anticorps monoclonal qui inhibe la liaison du VEGF aux récepteurs Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2) et du **brivanib**, inhibiteur de VEGFR2, FGFR-1 et FGFR2. Ces résultats encourageants ont renforcé l'intérêt de la recherche de petites molécules inhibitrices des protéines kinases impliquées dans la transduction des signaux mitogéniques et anti-apoptotiques (Knockaert et al, 2002). Les recherches sur ces molécules ont récemment abouti à l'identification de principes actifs, parfois issus de molécules naturelles (Bezivin et al, 2003; Fischer et al, 2003), dont la caractérisation des effets anti-mitotiques sur un large panel de tumeurs reste encore à exploiter. L'utilisation en clinique humaine de ces nouvelles thérapies reste encore limitée, en raison de leur coût et des effets secondaires, qui touchent des organes autres que le foie dus à l'administration par voie orale ou systémique. C'est pourquoi, ces nouvelles molécules seront testées en étant encapsulées.

a. Tests toxicologiques des inhibiteurs de protéines kinases libres

Plusieurs molécules appartenant aux inhibiteurs de protéines kinases, dérivées de la roscovitine fournies par L. Meijer, ont été testées en utilisant comme molécules de référence la doxorubicine et le taxol et leurs IC50 ont été déterminés.

Le taxol : Médicament utilisé dans le traitement du carcinome de l'ovaire, du sein et certains cancers du poumon. C'est un cytotoxique stabilisant le fuseau mitotique, ce qui permet de bloquer la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire.

La roscovitine : Découverte à Roscoff par L. Meijer (Groupe Protéines Kinases et Pathologies Humaines, Station biologique, CNRS, Roscoff), elle est un inhibiteur de protéines kinases impliquées dans la prolifération et le développement des cancers et des leucémies. Cette molécule et certains dérivés qui sont des compétiteurs de l'ATP, sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques contre les cancers du poumon, du nasopharynx et contre certaines maladies neurodégénératives.

SCR8 : Analogue de seconde génération de la Roscovitine, SCR8 cible les CDKs et induit l'inhibition de croissance de diverses cellules tumorales en culture (Bettayeb et al, 2008). SCR8 a une capacité d'induction de la mort cellulaire car elle inhibe plusieurs protéines kinases directement impliquées dans le cycle cellulaire et les voies de survie.

La mérioline 4 (MR4) : Molécule, dérivée de la roscovitine, récemment caractérisée pour ses effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur des cellules de neuroblastomes humains par son pouvoir inhibiteur vis-à-vis des Kinases Dépendantes des Cyclines ou CDKs (Bettayeb et al, 2007; Echalié et al, 2008). MR4 est un des composés de la famille des mériolines. Les mériolines sont des composés hybrides synthétisés à partir des Méridianines et des Variolines. Les méridianines sont des inhibiteurs de protéines kinases de la famille des 3-(2-amino-pyrimidine)-indoles isolés initialement à partir d'une ascidie marine (*Aplidium meridianum*). Les Variolines, qui ont été isolées à partir d'un autre organisme marin, une éponge de l'antarctique *Kirkpatrickia variolosa*, présentent des analogies de structure et fonctionnelles avec les Méridianines.

BJFP1022 : Nouvelle molécule fournie par L. Meijer, dont la structure est gardée confidentielle dans la perspective de futurs développements commerciaux et le dépôt éventuel d'un brevet.

Principes actifs	Lignées cellulaires						
	HuH7	HCT116	Caco	MDA	PC3	NCI	Fibroblastes
BJFP1022	25 nM	55nM	18nM	20nM	25nM	28nM	55nM
MR4	83nM	85nM	28nM	45nM	48nM	70nM	95nM
SCR8	47nM	90nM	20nM	50nM	32nM	87nM	90nM
Roscovitine	8,3µM	5,5µM	2,5µM	2,6µM	3,2µM	7,2µM	7,5µM
Taxol	4,9nM	<0,08nM	7,5nM	66nM	200nM	66nM	>200nM
Doxorubicine	22nM	22nM	22nM	7.5nM	200nM	>200nM	>200nM

Figure 7. IC50 des différents principes actifs. A partir des courbes des effets sur la densité cellulaire des molécules BJFP1022, MR4, SCR8, roscovitine, doxorubicine et taxol, les IC50 des différents composés ont été déterminés pour chaque lignée cellulaire. Les cultures avaient été traitées par ces composés et la densité cellulaire a été établie pour chaque lignée aux différentes doses de composés (de 1nM à 25 µM pour BJFP1022, MR4, SCR8 et roscovitine et, de 80 à 200 nM pour la doxorubicine et le taxol).

Le BJFP1022 semble la plus cytotoxique que les autres molécules, comme en témoigne les faibles IC50 obtenus sur les différentes lignées.

b. Tests toxicologiques des inhibiteurs de protéines kinases encapsulés

Cette étape a consisté à déterminer la densité cellulaire en fonction de la concentration en BJFP1022 seul ou encapsulé, correspondant à IC25, 50 et 75 sur des cellules d'hépatome HuH7 en culture. Le BJFP1022 seul a une toxicité dose-dépendante et encapsulé, la toxicité est proche de celle de la drogue seule. Ce résultat suggère que le composé a été efficacement encapsulé dans ces particules et délivré dans les cellules HuH7.

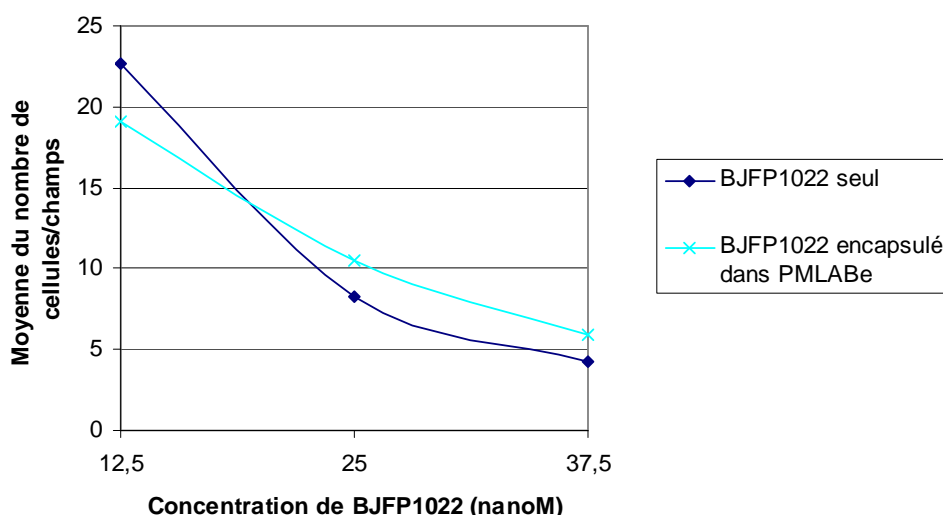


Figure 8. Viabilité cellulaire de la lignée HuH7 en fonction de la concentration BJFP1022 encapsulé ou non dans les nanoparticules. Nombre moyen de cellules HuH7 par champ en fonction de la concentration de BJFP1022 dans le milieu. BJFP1022 est seul dans le milieu ou encapsulé dans les nanoparticules (PMLABe).

Les trop petites quantités de BJFP1022 dont nous disposons n'ont pas permis d'évaluer le taux d'encapsulation de ces nouvelles molécules. Les expériences de cytotoxicité ont donc été menées sans la confirmation d'une encapsulation efficace du composé.

La toxicité des principes actifs simplement ajoutés aux nanoparticules a également été comparée à celle des principes actifs encapsulés. Le BJFP1022 avait été testé en présence de nanoparticules sans encapsulation et présentait une plus forte toxicité dès les premières valeurs, mais sans effet dose-réponse. Ces résultats ne sont pas présentés ici, car ils méritent d'être approfondis.

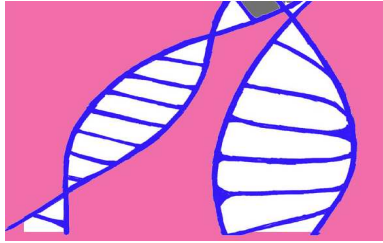
IV. Discussion et perspectives

Ces études préliminaires ont pu mettre en évidence l'absence de toxicité des nanoparticules vides et selon les formulations, l'augmentation de l'efficacité de la doxorubicine sur les cellules HuH7 par rapport à la doxorubicine libre. Ces résultats encourageants in vitro ne cachent cependant pas la nécessité de mettre au point les techniques in vivo. En effet, les résultats obtenus méritent d'être approfondis et les expériences de biodistribution renouvelées.

A l'avenir, les expériences basées sur les nanoparticules encapsulant des principes actifs, auront pour objectifs d'apporter des informations importantes sur la biodistribution, la pénétration intracellulaire des nanoparticules et la vectorisation de la doxorubicine, pour envisager des études in vivo avec les nouvelles molécules de la famille des inhibiteurs de protéines kinases.

Parmi les perspectives, nous souhaitons développer un modèle de carcinome hépatocellulaire chez la souris qui permette de tester nos formulations sur le développement tumoral et la survie des animaux.

Sur le plan de la chimie, de nombreuses perspectives découlent de ce travail. Il sera notamment intéressant de 1) corréler l'accumulation hépatique des nanoparticules en fonction de leur structure physicochimique, 2) mesurer la vitesse de libération du principe actif en fonction de la température et du pH, 3) mettre au point des synthèses permettant le greffage de ligands hépatotropes pour améliorer le ciblage.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »
Albert Einstein*

La stratégie de vectorisation des acides nucléiques et de drogues anticancéreuses dans les cellules hépatiques en culture s'inscrit à l'interface de la biologie, de la chimie et de la physique, comme en témoigne la chronologie du développement des nanotechnologies en annexe 12. Le chimiste Pierre Potier disait : « La chimie est à la biologie ce que le solfège est à la musique ». Ce domaine n'aurait pas pu voir le jour sans de nombreux progrès scientifiques et l'émergence de nouvelles méthodes qui ont été déterminants. La vectorisation a bénéficié des progrès de la médecine, de la chimie et de la physique distingués par les Prix Nobel. Les distinctions les plus pertinentes pour la vectorisation figurent en annexe 13.

Les progrès réalisés en 100 ans depuis le concept de « Magic Bullet » de Paul Ehrlich, (Annexe 14), ont été tels que son idée est devenue réalité comme en témoignent le développement et la mise sur le marché de thérapies ciblées, comme les thérapies génique, protéique, ou encore les nanomédicaments.

Le laboratoire INSERM U991 dispose d'une lignée cellulaire d'hépatome HepaRG. Les cellules sont des progéniteurs bipotents hépatiques capables de se différencier à confluence en cellules biliaires et hépatocytaires. Le niveau de différenciation est tel que ces cellules HepaRG différenciées sont très proches des hépatocytes en culture primaire, permettant des études de pharmaco-toxicologie et d'infection par le virus de l'hépatite B (Cerec et al, 2007). Mes travaux de thèse ont permis d'établir des protocoles efficaces de vectorisation des cellules HepaRG, indispensables pour le transfert d'acides nucléiques, d'oligonucléotides (siRNA et shRNA) en transfection stable et transitoire dans les cellules HepaRG progénitrices et différenciées, dans le cadre de thérapies respectivement sens et anti-sens, ainsi que de principes actifs. Les expériences effectuées ont mis au point des protocoles performants, par les méthodes chimiques (lipides cationiques) et physiques (microporation). Jusqu'alors, les faibles résultats obtenus avec les molécules commerciales de transfection ne permettaient d'atteindre que 20% d'efficacité de transfection avec une forte toxicité. La vectorisation d'acides nucléiques notamment par électroporation dans les cellules HepaRG progénitrices bipotentes représente un nouvel outil biotechnologique pour l'étude de ces cellules dans les domaines du cycle cellulaire, de la prolifération, du stress, du cancer, de la toxicité et du métabolisme des xénobiotiques.

I. Vectorisation non virale des cellules HepaRG

A chaque type cellulaire, correspond un protocole spécifique. Après confirmation des faibles résultats obtenus au moyen de molécules commerciales, nous avons testé un panel de conditions de vectorisation basées sur le criblage de lipides cationiques synthétisés par la plate-forme de Biogenouest® de production et de formulation de vecteurs de synthèse pour le transfert de gènes et de biomolécules in vitro et in vivo nommée **SynNanovect** (IBiSA). Après ajustement de nombreux paramètres, ces lipides cationiques ont permis d'optimiser les conditions de transfection pour atteindre 50% d'efficacité de transfection avec le BSV10-DOPE sans toxicité notable et à des rapports de charge de 1, synonymes de quantités de lipoplexes, vers les cellules HepaRG progénitrices **adhérentes**, très faibles et donc plus physiologiques.

L'efficacité de transfection des cellules progénitrices et différenciées de la lignée HepaRG, est largement supérieure par électroporation (>85%) avec une viabilité de 80% comparativement à la transfection par lipoplexes mais ne s'utilise que sur les cellules **en suspension**, ce qui peut modifier leur physiologie, leur cycle cellulaire, ou encore leur processus de différenciation. Il y a donc un intérêt certain à disposer de ces deux types de transfusions efficaces, afin de pouvoir choisir la technique la plus adaptée à la question scientifique posée.

Pour obtenir une expression à long terme dans les cellules en culture, les nouvelles techniques de recombinaison homologue basées sur les protéines en doigts de zinc sont prometteuses car elles pourraient, sans affecter le reste du génome ni perturber un oncogène, corriger de façon parfaitement ciblée la version indésirable d'un gène. De

même, les endonucléases introniques et intéines ou «homing endonucleases» sont capables de reconnaître et de couper les sites, correspondant généralement à des gènes sans intéine ou sans intron de classe I. La réparation de la cassure double brin par recombinaison homologue avec le gène contenant l'élément mobile conduit à l'insertion de l'intéine ou de l'intron de classe I au niveau de la cassure double brin.

Les vecteurs viraux présentent aussi les avantages requis pour l'expression à long terme en vue d'applications industrielles et d'essais thérapeutiques (expression à long terme, forte efficacité *in vivo* notamment les lentivirus et adénovirus) mais, ils restent difficiles et coûteux à produire en grande quantité et peuvent entraîner des réactions immunitaires dues aux protéines virales (Pitard, Congrès Nanovecteurs en cancérologie, Nantes, juin 2010). Nous avons donc choisi la vectorisation non virale pour sa non-immunogénicité, sa facilité et ses faibles coûts de production et la non intégration dans le génome.

Outre l'établissement de protocoles efficaces de vectorisation dans les cellules HepaRG (Annexe 10), les expériences ont permis de quantifier les efficacités de transfection définies par le pourcentage de cellules exprimant un gène rapporteur (exemple : GFP) et la charge plasmidique intracellulaire, pour mieux comprendre les limitations du transfert de gènes.

La charge intracellulaire en plasmide (nombre de copies) et le pourcentage de cellules exprimant la GFP ne sont pas proportionnels dans nos conditions expérimentales. Le nombre de copies de plasmides par cellule n'a toutefois pas été évalué, ce qui serait possible par des plasmides marqués à l'or puis d'un comptage. De même, la transfection d'une seule copie de plasmide GFP ne permettrait peut-être pas de voir la GFP en fluorescence. Même en dosant l'ADN restant dans le milieu, la quantité d'ADN entrant dans la cellule par rapport à ce qui est appliqué est difficile à estimer, car l'ADN adsorbé à la surface n'est pas aisément différenciable de l'ADN entré dans la cellule. En parallèle du marquage du plasmide, le lipide lié à l'ADN (et non le colipide) pourrait être marqué par un fluorochrome pour étudier leur dissociation, qui oppose les auteurs. La nature, la taille et/ou la composition du lipide cationique et du lipoplexe, en d'autres termes, leurs caractérisations physico-chimiques, influencent le trafic intracellulaire et le passage à travers l'enveloppe nucléaire. Les **facteurs limitants** sont le passage de l'enveloppe nucléaire et/ou la disponibilité des plasmides pour la machinerie transcription.

Le MM18-cholestérol passe facilement la membrane plasmique, peut-être grâce au colipide cholestérol, mais sa translocation nucléaire est entravée, contrairement au KLN47 et au BSV10-DOPE. Ce problème pourrait être dû soit à un blocage du lipoplexe au niveau de la sortie des endosomes/lysosomes, soit à une rétention du plasmide par les lipoplexes en agrégats multilamellaires très stables, ou encore, à un blocage au niveau du passage des pores nucléaires. Cette dernière hypothèse est cependant discutable, car certaines recherches tendent à démontrer que les pores nucléaires sont trop étroits pour permettre la translocation d'un lipoplexe ou même d'un plasmide, suggérant que le passage ne serait possible qu'au cours de la division cellulaire ou par fusion du lipoplexe avec l'enveloppe nucléaire (Khalil et al, 2006). L'expression d'un transgène après électroporation et la polyfection par le PEI notamment ne sont pas dépendantes du cycle cellulaire. Il serait donc intéressant de déterminer si la prolifération des cellules HepaRG diffère, selon que l'on transfecte les cellules par électroporation ou à l'aide des lipides cationiques. De plus, des expériences de trafic par colocalisation, immunomarquage ou hybridation *in situ* sont réalisables afin de quantifier la distribution de l'ADN dans le cytosol, les endosomes/lysosomes et le noyau, dans le but de déterminer le(s) lieu(x) exact(s) de la rétention des plasmides (Khalil et al, 2006; Montier et al, 2003). L'accumulation périnucléaire dans les endosomes et lysosomes visualisée pour l'ADN nu et les lipoplexes pourrait être complétée par des études de microscopie en temps réel avec un marquage plus intense des plasmides et une quantification automatisée et/ou par apoptome. Enfin, des observations en microscopie électronique pourraient déterminer sous quelle forme l'information génétique arrive au noyau : structure multilamellaire ou ADN nu, autrement dit complexe ADN/liposome dissocié ou non.

Enfin, il serait intéressant de caractériser la toxicité cellulaire de la transfection pour déterminer si la toxicité est due à l'ADN, aux lipides et/ou à la surexpression de la protéine (viabilité, LDH, Hsp70). Des mesures d'hépatotoxicité (AST, ALAT) et

d'inflammation pourront être évaluées. L'étude de l'induction de stress cellulaires peut être affinée à travers l'étude du stress oxydant, de l'apoptose (activités caspases) et des atteintes mitochondriales, ainsi que l'impact sur la prolifération cellulaire, notamment en utilisant les outils de la plate-forme ImpACcell.

En étudiant l'influence de la quantité d'ADN sur l'efficacité de transfection par électroporation, les taux de transfection se sont révélés meilleurs pour de faibles quantités d'ADN (0,5 µg). Le transfert de nombreuses copies du plasmide dans les cellules pourrait générer de la toxicité. Celle-ci pourrait être engendrée par l'entrée du plasmide lui-même et/ou par la surexpression de la GFP (induction d'un stress cellulaire). Pour répondre à cette question, la transfection des cellules par un plasmide non codant permettrait de déterminer si la toxicité provient de la protéine GFP ou de l'ADN.

Les différentes approches de vectorisation ne s'opposent pas mais sont complémentaires. En utilisant alternativement des lipides cationiques, des colipides, des polymères, mais aussi de l'histidine ou de l'imidazole, des séquences de localisation nucléaire NFκB, ainsi des molécules de PEG pour la furtivité, et des ligands, il doit être possible de cibler efficacement les hépatocytes normaux et transformés in vitro puis in vivo.

Les vecteurs évoluent rapidement avec l'apparition de vecteurs pH-sensibles et/ou température-sensibles, pour favoriser la sortie de l'endosome mais également le ciblage de tumeurs car l'environnement des cellules tumorales est plus acide en raison d'un métabolisme élevé dans la tumeur (Yatvin et al, 1980). Par ailleurs, des vecteurs plus fusogènes avec des complexes Red/Ox sensibles (Kang et al, 2008) se développent. Enfin, les vecteurs doivent répondre à un paradoxe : si le complexe ADN/vecteur à l'entrée de la cellule doit être stable pour franchir la membrane plasmique, en revanche, il doit être instable à proximité du noyau pour permettre la dissociation ADN/vecteur et la translocation nucléaire de l'ADN pour qu'il accède à la machinerie de transcription.

II. Applications

Les deux premières applications de nos tests de transfection de cellules HepaRG développées pendant les travaux de thèse concernent la **surexpression du gène CYP2E1**, pour l'étude du métabolisme des drogues prises en charge par ce cytochrome et **du gène de l'hepcidine** dont l'ARNm ni la protéine ne sont pas retrouvés dans les cellules HepaRG, en dépit de la présence du gène apparemment fonctionnel. La troisième application décrit l'**inhibition de l'expression du récepteur AhR** pour l'étude de son rôle dans l'induction des cytochromes CYP1A1 et CYP1A2.

Enfin, nous avons initié la caractérisation de nanoparticules formulées à partir de poly-acide malique. Les premiers tests concernaient la vectorisation de **principes actifs encapsulés dans ces nanoparticules** sur plusieurs lignées cellulaires humaines dans la perspective du ciblage du carcinome hépatocellulaire.

1. Surexpression du CYP2E1

Le CYP2E1 étant faiblement exprimé dans les cellules HepaRG, nos méthodes de vectorisation ont permis d'obtenir, par les lipides cationiques et l'électroporation, une surexpression de ce cytochrome impliqué, par exemple, dans le métabolisme du paracétamol et de l'éthanol. Nous disposons ainsi de cellules HepaRG exprimant de façon transitoire le CYP2E1 permettant des études de toxicité pour des molécules prises en charge par ce CYP P450.

Toutefois, l'obtention d'une lignée HepaRG recombinante exprimant de façon stable le CYP 2E1 serait un outil particulièrement intéressant qui éviterait la nécessité de transfections transitoires. Nous avons montré que l'obtention d'une lignée recombinante était possible en surexprimant une protéine de fusion Hpcidine-GFP à partir d'une construction plasmidique portant un gène de résistance à un antibiotique. Cependant, nous avons également montré que la sélection des cellules recombinantes sur le seul

critère de résistance à cette drogue ne suffit pas pour obtenir une population exprimant de façon homogène le gène d'intérêt. C'est pourquoi, nous mettons en place une double sélection (paragraphe 2 de ce chapitre).

De plus, l'expression du CYP2E1 est réprimée de façon post-transcriptionnelle par l'insuline. La croissance et la différenciation des cellules HepaRG étant très dépendantes de la présence de l'insuline, il pourrait être intéressant de développer un vecteur d'expression permettant la production d'un ARNm insensible à l'insuline. Sur la base des travaux du Dr. I. De Waziers, nous tentons de générer un vecteur d'expression incluant une séquence du CYP2E1 mutée sur plusieurs bases. Ces mutations ponctuelles étant silencieuses, la séquence en acides aminés restera inchangée. Ladite construction sera transfectée de façon stable dans les cellules HepaRG différenciées par électroporation, ce qui devrait permettre un niveau d'expression de CYP2E1 élevé sans affecter la prolifération ou la différenciation des cellules HepaRG progénitrices. Dans un premier temps, nous utiliserons un promoteur fort constitutif mais le vecteur d'expression pourrait être conçu avec un promoteur s'exprimant préférentiellement dans les cellules différenciées, par exemple, le promoteur du CYP3A4. De nouveaux xénobiotiques pourront ainsi être étudiés du point de vue du métabolisme et de l'hépatotoxicité.

2. AhR

Les protocoles d'électroporation mis en place ont permis de surexprimer un gène en transfectant un vecteur d'expression mais aussi d'inhiber l'expression d'un gène en transfectant des cellules HepaRG par un siRNA. L'inhibition du récepteur AhR a mis en évidence son implication dans l'induction transcriptionnelle des CYP1A1 et CYP1A2 par les amines aromatiques hétérocycliques. Nous avons observé que la transfection de siARN par électroporation ou un vecteur commercial, siPortamine (Ambion), permettait une charge intracellulaire en siARN marqué à la rhodamine très efficace dans les deux approches. Cependant, l'inhibition par le siARN de l'expression du récepteur AhR n'a été observée qu'avec le protocole d'électroporation suggérant à nouveau que le lipoplexe ne libère que partiellement le siARN au niveau intracellulaire et que l'appariement aux messagers est limité. Il nous paraît important de tester d'autres lipides cationiques pour ce type d'application en particulier les lipides issus de la plateforme SynNanoVect qui ont montré une bonne efficacité de transfection sur les vecteurs d'expression et qui pourraient être très efficaces pour cibler des ARNm cytoplasmiques.

3. Hepcidine

Après électroporation de cellules HepaRG par le vecteur d'expression porteur du cDNA de fusion hepcidine-GFP, une lignée recombinante stable a pu être établie. Le pourcentage de cellules positives pour l'expression du gène d'intérêt par le suivi de la GFP a pu être déterminé. Nos résultats indiquent que la sélection des cellules HepaRG seulement par la résistance à l'antibiotique G418 permet bien d'obtenir une population très résistante mais dont la proportion de cellules exprimant la protéine d'intérêt est faible. Ceci pose la question de l'acquisition de la résistance par ces cellules. S'agit-il d'une résistance acquise spontanément du fait de leur grande plasticité ou de remaniements de la construction insérée dans le génome ? Dans tous les cas, il apparaît essentiel de réaliser la sélection des cellules exprimant le gène d'intérêt sur un second critère. L'approche de dilutions multiples de la population résistante puis d'une sélection clonale est possible mais très fastidieuse. Nous avons préféré inclure dans le vecteur d'expression l'ADNc codant la GFP pour un tri cellulaire par cytométrie en flux. Ce même protocole pourrait être appliqué en générant non plus une fusion hepcidine-GFP mais un ADNc mettant en fusion les deux séquences codantes séparées par un IRES afin de transcrire un seul ARNm mais permettre une traduction séparée des deux protéines.

Pour notre étude pilote utilisant la protéine de fusion hepcidine-GFP, nous avons montré que la protéine chimérique était maturée et sécrétée. Les résultats permettent d'envisager l'étude du potentiel fonctionnel de cette chimère protéique.

Cependant, après électroporation, nous avons observé que l'expression de la GFP était considérablement plus élevée dans les cellules hépatiques que dans les cellules biliaires, alors que la fluorescence de la population de cellules progénitrices est relativement homogène. Cette différence d'expression sera investiguée.

Ce modèle nous a permis de générer une lignée recombinante stable qui présente un potentiel d'études intéressant sur la maturation et la sécrétion de l'hepcidine.

III. Nanoparticules et principes actifs

Après les thérapies qualifiées de gène-médicament, de protéine-médicament qui ciblent la cause et non plus les symptômes, depuis quelques années, émergent les nanomédicaments. Ces nanomédicaments sont des nanoparticules, composés de polymères, qui encapsulent des médicaments.

Les polymères sont beaucoup plus petits que les lipides cationiques et donc plus furtifs. Par ailleurs, la conception de nouveaux médicaments est difficile et longue, soit entre 7 et 15 ans entre l'entité chimique et l'autorisation de mise sur le marché (Caulin, 2002; Maffrand et al, 2002). Par conséquent, l'une des stratégies est d'encapsuler des principes actifs anti-cancéreux ayant déjà l'AMM, comme la doxorubicine, le cisplatine ou le sorafénib afin d'améliorer leur efficacité.

Toutefois, les nouveaux médicaments dits biologiques tels que le bevacizumab (Avastatin®, Genetech/Roche) qui est un anticorps anti-VEGF, ont des délais moyens de développement plus courts que les entités chimiques (Grabowski, 2008) et donnent des résultats encourageants tel que le Sorafénib dans le carcinome hépatocellulaire. Ces données incitent à poursuivre la caractérisation de nouvelles molécules notamment les inhibiteurs de protéines kinases, tels la roscovitine (L. Meijer). Nous avons testé plusieurs d'entre eux. L'effet anti-prolifératif de principes actifs fournis par L. Meijer en comparaison de la doxorubicine et du taxol a été évalué sur différentes lignées cellulaires humaines, et ils ont montré de grandes efficacités anti-proliférative et pro-apoptotique par rapport aux molécules de référence.

Les nanoparticules dérivées du poly-acide malique synthétisées à l'ENSCR, dans le but de vectoriser des drogues anti-cancéreuses ciblant le carcinome hépatocellulaire, ne présentaient aucune cytotoxicité détectable sur les différentes lignées. Par contre, elles encapsulent efficacement une drogue anticancéreuse comme la doxorubicine. Nos expériences préliminaires montrent qu'il est également possible d'encapsuler des inhibiteurs de protéines kinases tel que le BJFP1022. Pour des applications cliniques ultérieures, il est envisagé, pour ces nouvelles formes de vectorisation, des évaluations in vivo de leur capacité à cibler le foie et à bloquer la progression tumorale dans des modèles de CHC chez la souris.

IV. Perspectives générales

Les applications du transfert de gènes in vivo par les méthodes non virales dans la thérapie génique du cancer présentent deux limites principales que sont l'expression transitoire et la faible efficacité de transfection. Cela s'explique en partie par le fait que la cellule arrive à distinguer l'ADN génomique des ADN exogènes même intégrés et à exclure le transgène d'une transcription active (Pitard, Congrès Nanovecteurs en cancérologie, Nantes, juin 2010). En vectorisant des principes actifs anticancéreux, l'expression peut être à libération prolongée par des dispositifs parentéraux (gels, disques...). Du point de vue technique, les formulations doivent être plus stables, les

procédés dépourvus de solvants organiques, et rendant possible la co-encapsulation d'ingrédients actifs. Du point de vue biologique, aucun exemple de ciblage actif avec un ligand sur le marché n'existe, ni de ciblage subcellulaire. De nouvelles propriétés pour inhiber les pompes d'efflux responsables de la MDR (Multi Drug Resistance) sont attendues. Bien que les liposomes soient utilisés dans de nombreux essais cliniques en phases II et III, transportant de la vincristine ou des oligonucléotides antisens, un effort doit être porté sur la toxicologie des nanosystèmes (JP Benoît, Congrès Nanovecteurs en cancérologie, Nantes, juin 2010).

1. Modèles de culture : 3D

Afin de se rapprocher de la physiologie, l'optimisation de la culture *in vitro* passera à l'avenir par les cultures en 3 dimensions qui commencent d'ores et déjà à émerger. La culture *in vitro* « classique » ne réorganise pas la structure 3D. En effet, jusqu'à présent, les différents modèles de culture *in vitro* étaient bidimensionnels, ne représentant pas intégralement la réalité tissulaire constituant de véritables limites de ces modèles.

La transposition des données de l'*in vitro* à l'*in vivo* pose souvent des questions qui trouveront vraisemblablement quelques éléments de réponse dans les modèles 3D.

C'est notamment l'exemple de l'efficacité de la thérapie génique *in vitro* appliquée à des lignées cellulaires ou des cultures primaires confrontée aux échecs fréquents de la thérapie génique *in vivo*.

Une première amélioration avait consisté en l'immobilisation des cellules en suspension dans des billes d'alginate qui avait fourni des résultats très supérieurs par rapport aux cellules en suspension en cas de congélation.

Un modèle de culture 3D, plus précisément un bioréacteur à flux radial, a été mis au point par une équipe Japonaise (Hongo et al, 2005) pour cultiver des cellules HepG2. Cette lignée disponible, facile à faire proliférer avec une forte reproductibilité se caractérise cependant par de faibles expressions et inductions des gènes du métabolisme des drogues. Pour optimiser les fonctions spécifiques du foie humain de cette lignée qui en est dépourvue, les cellules ont été cultivées dans un système de culture 3D. De nombreux gènes du métabolisme des drogues ont été induits dans le système en 3D par rapport à la 2D d'une part et des fonctions spécifiques du foie humain sont apparues d'autre part, notamment l'induction du CYP 3A4.

D'autres modèles se développent comme le système d'Astra Zeneca R&D qui reproduit un lobule hépatique ainsi que des dispositifs microfluidiques qui eux, se situent davantage entre la 2D et la 3D en cours de développement par Griffith et Schuler à l'Institute of Bioengineering and Nanotechnology de Singapour en 2009.

Enfin, notre laboratoire en partenariat avec l'ENS-Cachan développe un modèle d'interaction tissulaire hépato-rénal dans une puce à cellules microfluidique dont l'application est le criblage pharmaceutique *in vitro* (Mercey et al, 2010).

Ces modèles cellulaires pourront être importants pour l'évaluation de modes de vectorisation et faciliter le passage des tests *in vitro* vers la vectorisation *in vivo*.

2. Molécules anti-cancéreuses

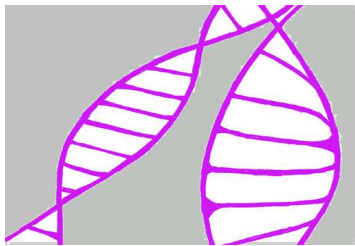
Outre les molécules testées au cours de la thèse, la plateforme ImPACcell tel un « cytoscanner » crible un très grand nombre de nouvelles molécules thérapeutiques sur différentes lignées cellulaires, ouvrant des perspectives d'utilisation des lignées humaines ainsi que des hépatocytes humains au cours du développement préclinique des médicaments (Guillouzo, 2008). Les nanotechnologies vont faciliter la découverte de médicaments. En effet, la miniaturisation des méthodes de criblage diminue la quantité et le volume des échantillons utilisés à une molécule-cible par spot. La précision de la réponse s'en trouve accrue, avec la possibilité de multiplier les opérations en parallèle.

En outre, la collaboration avec l'équipe de L. Meijer permet de tester de nouvelles molécules d'intérêt en pathologie humaine en particulier les inhibiteurs de protéines kinases (Beauchard et al, 2009). D'autres molécules d'origine marine pour des applications en chimiothérapie anticancéreuse connaissent un essor, dont des sucres à activités antitumorales mis en évidence dans l'algue rouge *Soliera chordalis*, valorisés par un brevet (Bondu et al, 2007). De même, une protéine de l'embryon d'oursin bloque très efficacement la prolifération de cellules leucémiques (Saad et al, 2007).

Le programme « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropôle Grand Ouest (<http://www.canceropole-grandouest.com>) recouvre le développement d'agents anticancéreux issus ou dérivés du milieu marin, essentiellement des molécules - hétérocycliques, macrocycliques, des alkylglycérols et des polysaccharides - synthétisées par des laboratoires de chimie organique. Il comprend aussi les interventions nutritionnelles, utilisant des lipides d'origine marine qui inhibent la croissance tumorale, sensibilisent les tumeurs aux agents anticancéreux, ou inhibent la cachexie tumorale. Ce projet a nécessité la complémentarité des laboratoires de chimie organique, des plateaux techniques capables d'explorer ces aspects biologiques et un réseau de services hospitaliers pour la réalisation des essais thérapeutiques.

Ainsi, l'interdisciplinarité des équipes de recherche permet l'extraction, l'analyse et la synthèse de molécules actives jusqu'aux études précliniques et cliniques (Forum « Exploitation industrielle des molécules d'origine marine » - Capbiotek, Cancale, 2009).

Les avancées de la recherche et de la technologie permettent de concevoir de nouveaux outils au service de la recherche médicale. Les mises au point et applications développées précédemment sur les lignées cellulaires humaines, notamment d'hépatomes, pourront faire émerger de nouvelles formes de thérapies.



BIBLIOGRAPHIE

*« Pour frayer un sentier nouveau, il faut être capable de s'égarer » Jean Rostand
Extrait des Inquiétudes d'un biologiste*

Thèses

Garnier D. Contrôle de la prolifération des hépatocytes différenciés : rôle de la protéine kinase Cdk1 et influence du microenvironnement cellulaire. Thèse de Biologie. Université de Rennes 1, 2008, p. 125.

Lagoudakis L. Ca^{2+} et régénération du foie : impact de la signalisation calcique intracellulaire sur la prolifération hépatocytaire. Thèse de Physiologie et physiopathologie. Université Pierre et Marie Descartes, 2009, p. 210.

Leblond J. Conception, synthèse et évaluation de systèmes de vectorisation non cationiques de l'ADN. Thèse de chimie moléculaire. Paris VI, 2005, p. 154.

Legendre C. Adaptation cellulaire et moléculaire des cellules d'hépatome humain HepaRG à un environnement hypoxique. Thèse de Biologie. Université de Rennes 1, 2009, p. 221.

Miramón M-L. Synthèse et évaluation de nouveaux vecteurs non-viraux biocompatibles pour le transfert de gènes. Thèse des sciences de la matière. Université de Rennes 1, 2001, p. 177.

Glossaire

Bitar, Terminologie de la thérapie génique, 2001.

Ouvrages

Benhamou J-P, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. 5^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2008, 220 p.

Fausto N. Liver regeneration. Eds D. Bernuau, G. Feldmann. John Libbey Eurotext. Paris, 1992, pp.1-6.

Fritsch H, Kühnel W. Atlas de poche d'Anatomie 2. Viscères. 4^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007, 449 p.

Gosling JA, Harris PF, Whitmore I, William PLT. Anatomie humaine. Atlas en couleurs. 2^{ème} édition française. Bruxelles : De Boeck, 2003, 377 p.

Moore KL, Dalley AF. Anatomie médicale. Aspects fondamentaux et applications cliniques. 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck, 2007, 1209p.

Netter, Frank H., M.D. Atlas d'Anatomie Humaine. 3^{ème} édition Paris : Masson, 2004, 542 p.

Putz R, Pabst R. Atlas d'anatomie humaine Sobotta. Tome 2, Tronc, viscères, membre inférieur. 4^{ème} édition française. Paris: Technique et Documentation, 2000, 403 p.

Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Atlas d'Anatomie Prométhée. Cou et organes internes. Paris : Maloine, 2007, 370 p.

Stevens A, Lowe J. Histologie humaine. 3^{ème} édition. Paris : Elsevier, 2006, 459 p.

Young B, Lowe J, Stevens A, Heath JW. Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather. 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck, 2008, 437 p.

Innovation Santé 2015 – LEEM-Recherche (Les Entreprises du Médicaments) 2007.

Congrès

Barbeau, Lainé, Lemiègre, Cammas-Marion, Benvegna. Archaeosomes : nouveaux outils pour la vectorisation de principes actifs et de gènes thérapeutiques. Colloque recherche de la fédération Gay-Lussac. La chimie du & pour le vivant, ENSC Rennes, 4 et 5 décembre 2008.

Benoît, Congrès Nanovecteurs en cancérologie, Nantes, juin 2010.

Cadeillan, Colloque recherche de la fédération Gay-Lussac. La chimie du & pour le vivant, ENSC Rennes, 4 et 5 décembre 2008.

Chevalier, Meijer - Conférence « Les molécules marines contre le cancer » - Ligue contre le cancer, Cancéropôle – Saint-Malo 2009.

Conchon S, 3^{ème} Colloque Génomique Fonctionnelle du Foie, Rennes, 2010.

Costantini, Soma. Clinical development of doxorubicin-loaded nanoparticles (Doxorubicin Transdrug[®]) for liver cancer treatment. XXI^{èmes} Journées Scientifiques du Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation - Paris, 2006.

Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Transcriptomic characterization of the multiple-step tumor progression in a c-Myc/Tgf alpha transgenic mouse model of HCC Conference Information: 57th Annual Meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases, OCT 27-31, 2006 Boston, MA. Source: HEPATOLOGY Volume: 44 Issue: 4 Pages: 620A-620A Supplement: Suppl. 1. Meeting Abstract: 1155 Published: OCT 2006.

Forum « Exploitation industrielle des molécules d'origine marine » - Capbiotek, Cancale, 2009.

Fraix, Laurent, Loyer, Jaffrès, Yaouanc, Montier, Lehn. Nouveaux lipides cationiques pour la transfection de cellules hépatiques, Congrès Grand Ouest - Société Chimique de France. Trégastel, 11-13 mai 2009.

Laurent-Puig, Module de cancérologie DCEM3, Faculté de Médecine Necker Enfants Malades, 2003/2004.

Lehn, 3^{ème} Carrefour OUEST-Genopole®, Brest, 2006.

Midoux. Le trafic intracellulaire des complexes ADN/vecteurs synthétiques. Projet fédérateur Vectorisation, atelier « Les vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes et de biomolécules », Brest, 17 octobre 2007.

Montier, Gen2Bio, les rencontres Biotech de Biogenouest, St-Malo, 2010.

Montier, Développement de vecteurs pour le transfert de bio-molécules : applications au domaine de la cancérologie. Conférences Master 2 – Cancéropole Grand Ouest, 2010.

Pitard, Congrès Nanovecteurs en cancérologie, Nantes, juin 2010.

Van Butsele, Passirani, Jérôme, Benoît, Jérôme. Congrès Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation (GTRV), Paris, 2006.

Sites internet

Académie de Médecine. Les causes du cancer en France, septembre 2007
<http://www.academie-medecine.fr/>

Académie Nationale de pharmacie
<http://www.acadpharm.org>

Biogenouest®

<http://www.ouest-genopole.org>

Bio Alliance Pharma

<http://www.bioalliancepharma.com/fre/R-D/Projets>

Cancéropôle Grand Ouest

<http://www.canceropole-grandouest.com>

Capbiotek

<http://www.capbiotek.fr>

Centre de biophysique moléculaire - Orléans

<http://www.cbm.cnrs-orleans.fr>

CNRS

<http://www2.cnrs.fr/presse/journal/3131.htm>

CNRS - Dossier sagascience – Nanotechnologie et santé :

<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosnano/decouv/vecto/vecto.htm>

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

<http://www.ensc-rennes.fr/genopole/>

Equipe HIP « Homéostasie Intracellulaire des Protéines », UMR CNRS 6026

<http://www.umar6026.univ-rennes1.fr/IPCweb/index.html>

Essais cliniques de thérapie génique

<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Expert Reviews in Molecular Medicine

<http://www.expertreviews.org/>

INSERM U991 « Foie, Métabolismes et Cancer » - Rennes

<http://www.insermu991.univ-rennes1.fr/>

INSERM U948 « Laboratoire de Biothérapies Hépatiques » - Rennes

<http://www.ifr26.nantes.inserm.fr>

INSERM U646 « Ingénierie de la Vectorisation Particulaire » - Angers

<http://www.u646.angers.inserm.fr/>

Institut de la Veille Sanitaire

<http://www.invs.sante.fr>

Interactions du Cytochromes P450

<http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp> ou www.drug-interactions.com

International Cancer Genome Consortium

<http://www.icgc.org>

Laboratoire de Biothérapies Innovantes (URU 341 en émergence) - Rennes

<http://biotherapies-innovantes.univ-rennes1.fr/>

Nature

<http://www.nature.com/nrc/posters/subpathways/index.html>

Plate-forme d'imagerie - Puces à cellules ImPACcell
<http://imagerie-puces-a-cellules.univ-rennes1.fr/>

Plateforme de production de nanovecteurs synthétiques pour le transfert de gènes et de biomolécules d'intérêt thérapeutique (SynNanoVect)
<http://www.synnanovect.ueb.fr>

Plate-forme de production de vecteurs viraux de transfert de gènes développée au sein du Laboratoire de thérapie génique du CHU de Nantes (INSERM U649)
<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>

Prix Nobel
<http://nobelprize.org>
http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_physiologie_ou_medecine
http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_chimie
http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_physique

Rapport de l'Inca, 2007. Le cancer en France en 2007
<http://www.e-cancer.fr/>

Thésaurus National de Cancérologie Digestive
<http://www.snfge.org/data/ModuleDocument/publication/5/pdf/TNCD-chapitre-903.pdf>

Brevets

Brevet INSERM N°FR 01 99 044 : Lignée HepaRG

Brevet WO/2009/055480 : Signature TGF- β

Brevet International PCT n° FR03/50116 - 07/11/2003 : Lipophosphoramidates

Références bibliographiques

Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB (2006) Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **24**: 4293-4300

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**: 615-616

Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaium A, Ferster A, Duppenhaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Marktel S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG (2009) Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *The New England journal of medicine* **360**: 447-458

Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 43-47

Al-Hajj M, Clarke MF (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**: 7274-7282

- Albrecht T (2008) [HCC screening]. *Radiologe* **48**: 33-38
- Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Baba Y, Kiwada H (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Archives of biochemistry and biophysics* **410**: 246-253
- Amaral JD, Castro RE, Steer CJ, Rodrigues CM (2009) p53 and the regulation of hepatocyte apoptosis: implications for disease pathogenesis. *Trends Mol Med* **15**: 531-541
- Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouet S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* **34**: 75-83
- Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN (2008) Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **48**: 2047-2063
- Audard V, Grimber G, Elie C, Radenen B, Audebourg A, Letourneur F, Soubrane O, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Cavard C, Terris B (2007) Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol* **212**: 345-352
- Bala S, Marcos M, Szabo G (2009) Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* **15**: 5633-5640
- Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B (2002) Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology (Baltimore, Md)* **35**: 1144-1152
- Barbosa ME, Bouteiller L, Cammas-Marion S, Montembault V, Fontaine L, Ponchel G (2008) Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly(gamma-benzyl L-glutamate)-beta-cyclodextrin. *J Mol Recognit* **21**: 169-178
- Beauchard A, Laborie H, Rouillard H, Lozach O, Ferandin Y, Le Guevel R, Guguen-Guillouzo C, Meijer L, Besson T, Thierry V (2009) Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17**: 6257-6263
- Beaumelle B, Alami M, Taupiac MP (2001) [Endosomes and toxin translocation]. *Journal de la Societe de biologie* **195**: 235-242
- Beaumont N, Vaulont (2003) Hpcidin, a key regulator of iron metabolism. *Hématologie* **9**: 27-36
- Behr (1993) Synthetic Gene-Transfer Vectors. *Acc Chem Res* **26**: 274-278
- Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989) Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6982-6986
- Benhamiche AM, Faivre C, Minello A, Clinard F, Mitry E, Hillon P, Faivre J (1998) Time trends and age-period-cohort effects on the incidence of primary liver cancer in a well-defined French population: 1976-1995. *Journal of hepatology* **29**: 802-806
- Bertin S, Neves S, Pedroso de Lima M, Pierrefite-Carle V (2007) [Naked DNA and lipoplexes applications in cancer gene therapy]. *Bulletin du cancer* **94**: 243-252
- Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**: 5797-5807

- Bettayeb K, Tirado OM, Marionneau-Lambot S, Ferandin Y, Lozach O, Morris JC, Mateo-Lozano S, Drueckes P, Schachtele C, Kubbutat MH, Liger F, Marquet B, Joseph B, Echalié A, Endicott JA, Notario V, Meijer L (2007) Meriolins, a new class of cell death inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer research* **67**: 8325-8334
- Bezivin C, Tomasi S, Lohezic-Le Devehat F, Boustie J (2003) Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* **10**: 499-503
- Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D (2004) Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *The journal of gene medicine* **6 Suppl 1**: S11-23
- Boige V BJ, Rosmorduc O; Groupe de travail carcinome hépatocellulaire Prodige-Afef. (2008) Use of sorafenib (Nexavar) in the treatment of hepatocellular carcinoma: PRODIGE AFEF recommendations. *Gastroenterol Clin Biol*
- Bondu S, Kervarec N, Deslandes E, Pichon R (2007) Separation of floridoside and isofloridosides by HPLC and complete (1)H and (13)C NMR spectral assignments for D-isofloridoside. *Carbohydrate research* **342**: 2470-2473
- Boucher E, Bouguen G, Garin E, Guillygomarch A, Boudjema K, Raoul JL (2008) Adjuvant intraarterial injection of 131I-labeled lipiodol after resection of hepatocellular carcinoma: progress report of a case-control study with a 5-year minimal follow-up. *J Nucl Med* **49**: 362-366
- Boucher E, Corbinais S, Brissot P, Boudjema K, Raoul JL (2002) Treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) with systemic chemotherapy combining epirubicin, cisplatin and infusional 5-fluorouracil (ECF regimen). *Cancer Chemother Pharmacol* **50**: 305-308
- Boucher E, Garin E, Guyllygomarc'h A, Olivie D, Boudjema K, Raoul JL (2007) Intra-arterial injection of iodine-131-labeled lipiodol for treatment of hepatocellular carcinoma. *Radiother Oncol* **82**: 76-82
- Boucquey A, Vilhardt F, Mitrovic T, Franco D, Weber A, Horellou P (2005) Retroviral display of urokinase-binding domain fused to amphotropic envelope protein. *Biochemical and biophysical research communications* **331**: 1485-1493
- Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, Le Gallo M, Thomas de la Pintière C, Daniel P, Genetet N, Meunier B, Dupont-Bierre E, Boudjema K, Catros V (2008) Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* **57**: 531-539
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7297-7301
- Bouvier (2003) Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers primitifs du foie en France en 2000 et évolution depuis 20 ans. *BEH*
- Bouvier AM, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, Tretarre B, Velten M, Dancourt V, Menegoz F, Guizard AV, Mace Lesec'h J, Peng J, Bercelli P, Arveux P, Esteve J, Faivre J (2004) Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28**: 877-881

Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D, Carr BI (1995) Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: inhibitory actions of vitamin K. *Journal of cellular physiology* **165**: 459-467

Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J (2007) Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology (Baltimore, Md)* **45**: 42-52

Boyer K (1999) Thérapie génique anticancéreuse par gènes suicides : du gène à l'essai thérapeutique. *Médecine/sciences* **15**: 625-634

Boztug S, Schwarzer, et al. (2009) HSC gene therapy in two WAS patients. *Hum Gene Ther* **20**: 1371

Brierley CH, Burchell B (1993) Human UDP-glucuronosyl transferases: chemical defence, jaundice and gene therapy. *Bioessays* **15**: 749-754

Brix LA, Nicoll R, Zhu X, McManus ME (1998) Structural and functional characterisation of human sulfotransferases. *Chem Biol Interact* **109**: 123-127

Bruix J, Sherman M (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **42**: 1208-1236

Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, Kursa M, Wagner E (2002) Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther* **5**: 80-86

Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotten M, Saltik M, Wagner E (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene therapy* **7**: 401-407

Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA (2000) Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *The journal of gene medicine* **2**: 76-88

Cammas S, Bear MM, Moine L, Escalup R, Ponchel G, Kataoka K, Guerin P (1999) Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *International journal of biological macromolecules* **25**: 273-282

Campbell EM, Hope TJ (2003) Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Advanced drug delivery reviews* **55**: 761-771

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrere F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougneres P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science (New York, NY)* **326**: 818-823

Castell JV, Jover R, Martinez-Jimenez CP, Gomez-Lechon MJ (2006) Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**: 183-212

- Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N (2003) [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)* **19**: 43-53
- Caulin C (2002) [From the chemical product to the authorization of drug marketing]. *La Revue du praticien* **52**: 486-490
- Cavazzana-Calvo M, Fischer A (2007) Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *The Journal of clinical investigation* **117**: 1456-1465
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A (2010) [Ten years of gene therapy: thoughts and perspectives]. *Med Sci (Paris)* **26**: 115-118
- Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A (2007) Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology (Baltimore, Md)* **45**: 957-967
- Chaerkady R, Harsha HC, Nalli A, Gucek M, Vivekanandan P, Akhtar J, Cole RN, Simmers J, Schulick RD, Singh S, Torbenson M, Pandey A, Thuluvath PJ (2008) A quantitative proteomic approach for identification of potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* **7**: 4289-4298
- Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A (2009) Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer letters* **286**: 145-153
- Cho HA, Park IS, Kim TW, Oh YK, Yang KS, Kim JS (2009) Suppression of hepatitis B virus-derived human hepatocellular carcinoma by NF-kappaB-inducing kinase-specific siRNA using liver-targeting liposomes. *Archives of pharmacal research* **32**: 1077-1086
- Chuang E, Wiener N, Christos P, Kessler R, Cobham M, Donovan D, Goldberg GL, Caputo T, Doyle A, Vahdat L, Sparano JA (2010) Phase I trial of ixabepilone plus pegylated liposomal doxorubicin in patients with adenocarcinoma of breast or ovary. *Ann Oncol*
- Ciron C, Cressant A, Roux F, Raoul S, Cherel Y, Hantraye P, Deglon N, Schwartz B, Barkats M, Heard JM, Tardieu M, Moullier P, Colle MA (2009) Human alpha-iduronidase gene transfer mediated by adeno-associated virus types 1, 2, and 5 in the brain of nonhuman primates: vector diffusion and biodistribution. *Hum Gene Ther* **20**: 350-360
- Ciron C, Desmaris N, Colle MA, Raoul S, Joussemet B, Verot L, Ausseil J, Froissart R, Roux F, Cherel Y, Ferry N, Lajat Y, Schwartz B, Vanier MT, Maire I, Tardieu M, Moullier P, Heard JM (2006) Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Annals of neurology* **60**: 204-213
- Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R (2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *The New England journal of medicine* **356**: 1545-1559
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**: 1073-1081
- Compagnon P, Grandadam S, Lorho R, Turlin B, Camus C, Jianrong Y, Laine F, Meunier B, Deugnier Y, Boudjema K (2008) Liver transplantation for hepatocellular carcinoma without preoperative tumor biopsy. *Transplantation* **86**: 1068-1076
- Consalvo M, Mullen CA, Modesti A, Musiani P, Allione A, Cavallo F, Giovarelli M, Forni G (1995) 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to

express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J Immunol* **154**: 5302-5312

Corona G, De Lorenzo E, Elia C, Simula MP, Avellini C, Baccarani U, Lupo F, Tiribelli C, Colombatti A, Toffoli G (2010) Differential proteomic analysis of hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* **36**: 93-99

Cottone M, Virdone R, Fusco G, Orlando A, Turri M, Caltagirone M, Maringhini A, Sciarrino E, Demma I, Nicoli N, et al. (1989) Asymptomatic hepatocellular carcinoma in Child's A cirrhosis. A comparison of natural history and surgical treatment. *Gastroenterology* **96**: 1566-1571

Coughtrie MW, Sharp S, Maxwell K, Innes NP (1998) Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact* **109**: 3-27

Coulouarn C, Derambure C, Lefebvre G, Daveau R, Hiron M, Scotte M, Francois A, Daveau M, Salier JP (2005) Global gene repression in hepatocellular carcinoma and fetal liver, and suppression of dudulin-2 mRNA as a possible marker for the cirrhosis-to-tumor transition. *Journal of hepatology* **42**: 860-869

Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS (2009) Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **28**: 3526-3536

Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS (2008) Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology (Baltimore, Md)* **47**: 2059-2067

Coulouarn C, Gomez-Quiroz LE, Lee JS, Kaposi-Novak P, Conner EA, Goldina TA, Onishchenko GE, Factor VM, Thorgeirsson SS (2006) Oncogene-specific gene expression signatures at preneoplastic stage in mice define distinct mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **44**: 1003-1011

Coulouarn C, Lefebvre G, Derambure C, Lequerre T, Scotte M, Francois A, Cellier D, Daveau M, Salier JP (2004) Altered gene expression in acute systemic inflammation detected by complete coverage of the human liver transcriptome. *Hepatology (Baltimore, Md)* **39**: 353-364

Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P (1979) Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **31**: 331-332

Couvreur P, Tulkens P, Roland M, Trouet A, Speiser P (1977) Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier. *FEBS letters* **84**: 323-326

Crettol S, Petrovic N, Murray M (2009) Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism. *Curr Pharm Des*

Daveau M, Scotte M, Francois A, Coulouarn C, Ros G, Tallet Y, Hiron M, Hellot MF, Salier JP (2003) Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* **36**: 130-141

de Verdiere AC, Dubernet C, Nemati F, Soma E, Appel M, Ferte J, Bernard S, Puisieux F, Couvreur P (1997) Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *British journal of cancer* **76**: 198-205

- De Waziers I, Garlatti M, Bouguet J, Beaune PH, Barouki R (1995) Insulin down-regulates cytochrome P450 2B and 2E expression at the post-transcriptional level in the rat hepatoma cell line. *Molecular pharmacology* **47**: 474-479
- Dilou N, Patouillard B, Audigier JC (2004) [Staging systems in hepatocellular carcinoma]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28**: 359-366
- Dobson J (2006) Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene therapy* **13**: 283-287
- Dobson J (2010) Cancer therapy: A twist on tumour targeting. *Nature materials* **9**: 95-96
- Dolle L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA, Geerts A (2009) The quest for liver progenitor cells: A practical point of view. *Journal of hepatology*
- Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2008) Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* **9**: 1-11
- Echalier A, Bettayeb K, Ferandin Y, Lozach O, Clement M, Valette A, Liger F, Marquet B, Morris JC, Endicott JA, Joseph B, Meijer L (2008) Meriolins (3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): synthesis, kinase inhibitory activity, cellular effects, and structure of a CDK2/cyclin A/meriolin complex. *Journal of medicinal chemistry* **51**: 737-751
- Edeline J, Raoul JL, Vauleon E, Guillygomac'h A, Boudjema K, Boucher E (2009) Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: a retrospective study. *World J Gastroenterol* **15**: 713-716
- Edmondson HA, Steiner PE (1954) Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* **7**: 462-503
- El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **134**: 1752-1763
- El Hage F, Abouzahr-Rifai S, Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S (2008) [Immune response and cancer]. *Bulletin du cancer* **95**: 57-67
- Enomoto M, Nagayama H, Sato K, Xu Y, Asano S, Takahashi TA (2000) In vitro generation of dendritic cells derived from cryopreserved CD34+ cells mobilized into peripheral blood in lymphoma patients. *Cytotherapy* **2**: 95-104
- Escriu V, Carriere M, Bussone F, Wils P, Scherman D (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *The journal of gene medicine* **3**: 179-187
- Farazi PA, DePinho RA (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews* **6**: 674-687
- Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA (2003) Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **63**: 5021-5027
- Farhood H, Serbina N, Huang L (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et biophysica acta* **1235**: 289-295
- Fatourou EM, Koskinas JS (2009) Adaptive immunity in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* **9**: 1499-1510

- Faulds D, Heel RC (1990) Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* **39**: 597-638
- Fausto N (1991) Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Progress in growth factor research* **3**: 219-234
- Fausto N (2000) Liver regeneration. *Journal of hepatology* **32**: 19-31
- Fausto N (2004) Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* **39**: 1477-1487
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)* **43**: S45-53
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 7413-7417
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* **18**: 581-592
- Ferry N (2003) [Gene therapy and liver diseases]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **27**: 288-290
- Ferry N (2009) Current gene therapy. *Current gene therapy* **9**: 61
- Fischer A, Hacein-Bey S, Le Deist F, de Saint Basile G, Cavazzana-Calvo M (2001) Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Immunity* **15**: 1-4
- Fischer PM, Endicott J, Meijer L (2003) Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Progress in cell cycle research* **5**: 235-248
- Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L, Carr BI, Sun D, Porter KA, Van Thiel DH, Starzl TE (1994) Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)* **19**: 210-216
- Fumoto S, Kawakami S, Ito Y, Shigeta K, Yamashita F, Hashida M (2004) Enhanced hepatocyte-selective in vivo gene expression by stabilized galactosylated liposome/plasmid DNA complex using sodium chloride for complex formation. *Mol Ther* **10**: 719-729
- Garcia-Tsao G (2001) Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* **120**: 726-748
- Gardmo C, Kotokorpi P, Helander H, Mode A (2005) Transfection of adult primary rat hepatocytes in culture. *Biochemical pharmacology* **69**: 1805-1813
- Garin E, Rolland Y, Boucher E, Ardisson V, Laffont S, Boudjema K, Bourguet P, Raoul JL (2010) First experience of hepatic radioembolization using microspheres labelled with yttrium-90 (TheraSphere): practical aspects concerning its implementation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **37**: 453-461
- Garnier D, Loyer P, Ribault C, Guguen-Guillouzo C, Corlu A (2009) Cyclin-dependent kinase 1 plays a critical role in DNA replication control during rat liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)* **50**: 1946-1956

- Gerolami R, Uch R, Brechot C, Mannoni P, Bagnis C (2003) Gene therapy of hepatocarcinoma: a long way from the concept to the therapeutical impact. *Cancer gene therapy* **10**: 649-660
- Gerolami R, Uch R, Cardoso J, Bagnis C, Mannoni P, Brechot C (2001) [Gene therapy for hepatocellular carcinoma. From the idea to clinical trials]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **25**: 273-286
- Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C (2002a) Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *The Journal of biological chemistry* **277**: 49220-49229
- Gilot D, Miramon ML, Benvegna T, Ferrieres V, Loreal O, Guguen-Guillouzo C, Plusquellec D, Loyer P (2002b) Cationic lipids derived from glycine betaine promote efficient and non-toxic gene transfection in cultured hepatocytes. *The journal of gene medicine* **4**: 415-427
- Glaise D, Ilyin GP, Loyer P, Cariou S, Bilodeau M, Lucas J, Puisieux A, Ozturk M, Guguen-Guillouzo C (1998) Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth Differ* **9**: 165-176
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* **4**: 292-312
- Gomez-Lechon MJ, Donato T, Jover R, Rodriguez C, Ponsoda X, Glaise D, Castell JV, Guguen-Guillouzo C (2001) Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *Eur J Biochem* **268**: 1448-1459
- Goncalves C, Mennesson E, Fuchs R, Gorvel JP, Midoux P, Pichon C (2004) Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Mol Ther* **10**: 373-385
- Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW (2000) Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* **156**: 607-619
- Grabowski H (2008) Follow-on biologics: data exclusivity and the balance between innovation and competition. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 479-488
- Graham FL, van der Eb AJ (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**: 536-539
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15655-15660
- Grisham JW (1962) A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer research* **22**: 842-849
- Grognet JM (2008) [Nanotechnologies: from information sciences to pharmacology]. *Therapie* **63**: 1-9

- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine* **8**: 128-135
- Guguen-Guillouzo C, Bourel M, Guillouzo A (1986) Human hepatocyte cultures. *Progress in liver diseases* **8**: 33-50
- Guguen-Guillouzo C, Clement B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, Guillouzo A (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* **143**: 47-54
- Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (1983) Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* **53-54**: 35-56
- Guillouzo A (1998) Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 2**: 511-532
- Guillouzo A (2008) [New perspectives in the use of human hepatocytes in the preclinical drug development process]. *Ann Pharm Fr* **66**: 288-295
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C (2007) The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* **168**: 66-73
- Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C (2008) Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**: 1279-1294
- Gupta P, Lee KH (2007) Genomics and proteomics in process development: opportunities and challenges. *Trends in biotechnology* **25**: 324-330
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England journal of medicine* **346**: 1185-1193
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, NY)* **302**: 415-419
- Hagenbuch B (2010) Drug uptake systems in liver and kidney: a historic perspective. *Clin Pharmacol Ther* **87**: 39-47
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F (2009) Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol* **90**: 127-135
- Hasegawa K, Kokudo N (2009) Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* **39**: 833-843

Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**: 445-600

Heller L, Jaroszeski MJ, Coppola D, Pottinger C, Gilbert R, Heller R (2000) Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene therapy* **7**: 826-829

Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2006) Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol* **12**: 6085-6097

Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2007) Gene therapy of liver cancer. *Ann Hepatol* **6**: 5-14

Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS (1994) Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* **5**: 1477-1483

Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa Y, Kobayashi T, Honda H (2005) Three-dimensional high-density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction of artificial liver. *Journal of bioscience and bioengineering* **99**: 237-244

Houdebine LM (2009) [Applications of genetically modified animals]. *Journal de la Societe de biologie* **203**: 323-328

Hu D, Valentine M, Kidd VJ, Lahti JM (2007) CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *Journal of cell science* **120**: 2424-2434

Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC (2007) TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* **26**: 2166-2176

Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP (2009) Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *International journal of pharmaceutics* **379**: 201-209

Hwang LH (2006) Gene therapy strategies for hepatocellular carcinoma. *Journal of biomedical science* **13**: 453-468

Iqbal S, Tsao-Wei DD, Quinn DI, Gitlitz BJ, Groshen S, Aparicio A, Josef Lenz H, El-Khoueiry A, Pinski J, Garcia AA (2010) Phase I Clinical Trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin and Docetaxel in Patients With Advanced Solid Tumors. *American journal of clinical oncology*

Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**: 463-468

Ishizawa T, Mise Y, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N (2009) Surgical technique: new advances for expanding indications and increasing safety in liver resection for HCC : The Eastern perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*
 Jabari S, Meissnitzer M, Quint K, Gahr S, Wissniowski T, Hahn EG, Neureiter D, Ocker M (2009) Cellular plasticity of trans- and dedifferentiation markers in human hepatoma cells in vitro and in vivo. *International journal of oncology* **35**: 69-80

Jackson ME, Simpson JC, Girod A, Pepperkok R, Roberts LM, Lord JM (1999) The KDEL retrieval system is exploited by Pseudomonas exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1,

during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **112** (Pt 4): 467-475

Johannes L, Lamaze C (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **3**: 443-451

Johnson PJ (1996) The epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **8**: 845-849

Johnsson N, Varshavsky A (1994) Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *The EMBO journal* **13**: 2686-2698

Josse R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul JM, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2008) Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* **36**: 1111-1118

Kabanov AV, Astafyeva IV, Chikindas ML, Rosenblat GF, Kiselev VI, Severin ES, Kabanov VA (1991) DNA interpolyelectrolyte complexes as a tool for efficient cell transformation. *Biopolymers* **31**: 1437-1443

Kang JH, Asai D, Kim JH, Mori T, Toita R, Tomiyama T, Asami Y, Oishi J, Sato YT, Niidome T, Jun B, Nakashima H, Katayama Y (2008) Design of polymeric carriers for cancer-specific gene targeting: utilization of abnormal protein kinase Calpha activation in cancer cells. *Journal of the American Chemical Society* **130**: 14906-14907

Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS (2006) Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *The Journal of clinical investigation* **116**: 1582-1595

Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD (2003) Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nature reviews* **3**: 321-329

Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews* **58**: 32-45

Klaassen CD, Aleksunes LM (2010) Xenobiotic, bile Acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews* **62**: 1-96

Knockaert M, Greengard P, Meijer L (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in pharmacological sciences* **23**: 417-425

Koltover I, Salditt T, Radler JO, Safinya CR (1998) An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science (New York, NY)* **281**: 78-81

Korb V, Tep K, Escriou V, Richard C, Scherman D, Cynober L, Chaumeil J, Dumortier G (2008) Current data on ATP-containing liposomes and potential prospects to enhance cellular energy status for hepatic applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **25**: 305-345

Kuang M, Peng BG, Lu MD, Liang LJ, Huang JF, He Q, Hua YP, Totsuka S, Liu SQ, Leong KW, Ohno T (2004) Phase II randomized trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 1574-1579

Kung JW, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA (2010) Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 984248

- Kung JW, Forbes SJ (2009) Stem cells and liver repair. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 568-574
- Kuriyama S, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Tsujimoto T, Yamazaki M, Fukui H (2000) Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene therapy* **7**: 1132-1136
- Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K (2006) Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* **99**: 671-678
- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J (2008) MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology (Baltimore, Md)* **47**: 1955-1963
- Laine C, Mornet E, Lemiegre L, Montier T, Cammas-Marion S, Neveu C, Carmoy N, Lehn P, Benvegna T (2008) Folate-equipped pegylated archaeal lipid derivatives: synthesis and transfection properties. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **14**: 8330-8340
- Lamarche F, Mevel M, Montier T, Burel-Deschamps L, Giamarchi P, Tripier R, Delepine P, Le Gall T, Cartier D, Lehn P, Jaffres PA, Clement JC (2007) Lipophosphoramidates as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconjugate chemistry* **18**: 1575-1582
- Lamaze C, Schmid SL (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Current opinion in cell biology* **7**: 573-580
- Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J (2001) Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* **120**: 1763-1773
- Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J (2006) Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* **25**: 3778-3786
- Le Gall T, Loizeau D, Picquet E, Carmoy N, Yaouanc JJ, Burel-Deschamps L, Delepine P, Giamarchi P, Jaffres PA, Lehn P, Montier T (2010) A novel cationic lipophosphoramidate with diunsaturated lipid chains: synthesis, physicochemical properties, and transfection activities. *Journal of medicinal chemistry* **53**: 1496-1508
- Le Gallo M, Toutirais O, Montier T, Cabillic F, Bouet F, Delepine P, Lehn P, Jotereau F, Catros V (2008) Activation of tumor-specific T cells by dendritic cells expressing the NY-ESO-1 antigen after transfection with the cationic lipophosphoramidate KLN5. *The journal of gene medicine* **10**: 628-636
- Leboulch P (2009) Conversion to transfusion independence with partial clonal dominance after lentiviral gene therapy for severe human beta-thalassemia. *Hum Gene Ther* **20**: 1369-1370
- Lechardeur D, Lukacs GL (2006) Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther* **17**: 882-889
- Leclercq H, Bruyns, Faid, Gangji, Velu (1999) Immunothérapie génique du cancer : bilan et perspectives. *Med Sci (Paris)* **15**: 635-644

- Lecomte (2006) Pharmacogénétique en hépato-gastroentérologie. *Hépatogastro* **13**: 275-287
- Lee CM, Tanaka T, Murai T, Kondo M, Kimura J, Su W, Kitagawa T, Ito T, Matsuda H, Miyasaka M (2002) Novel chondroitin sulfate-binding cationic liposomes loaded with cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in vivo. *Cancer research* **62**: 4282-4288
- Lee WC, Yu MC, Chen MF (2004) Prognostic impact of Fas ligand on hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *World J Surg* **28**: 792-796
- Legendre C, Hori T, Loyer P, Aninat C, Ishida S, Glaise D, Lucas-Clerc C, Boudjema K, Guguen-Guillouzo C, Corlu A, Morel F (2009) Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1 α involvement in CYP3A4 repression. *Eur J Cancer* **45**: 2882-2892
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science (New York, NY)* **312**: 104-107
- Levrero M (2006) Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* **25**: 3834-3847
- Li S, Ma Z (2001) Nonviral gene therapy. *Current gene therapy* **1**: 201-226
- Liu F, Huang L (2002a) Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy* **9**: 1116-1119
- Liu F, Huang L (2002b) Noninvasive gene delivery to the liver by mechanical massage. *Hepatology (Baltimore, Md)* **35**: 1314-1319
- Llovet JM (2005) Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **40**: 225-235
- Llovet JM, Bruix J (2008) Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **48**: 1312-1327
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* **359**: 378-390
- Loison F, Debure L, Nizard P, le Goff P, Michel D, le Drean Y (2006) Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *The Biochemical journal* **395**: 223-231
- Loison F, Nizard P, Sourisseau T, Le Goff P, Debure L, Le Drean Y, Michel D (2005) A ubiquitin-based assay for the cytosolic uptake of protein transduction domains. *Mol Ther* **11**: 205-214
- Longmuir KJ, Robertson RT, Haynes SM, Baratta JL, Waring AJ (2006) Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence. *Pharmaceutical research* **23**: 759-769
- Loyer P, Cariou S, Glaise D, Bilodeau M, Baffet G, Guguen-Guillouzo C (1996) Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in

- vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *The Journal of biological chemistry* **271**: 11484-11492
- Loyer P, Trembley JH, Grenet JA, Busson A, Corlu A, Zhao W, Kocak M, Kidd VJ, Lahti JM (2008) Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *The Journal of biological chemistry* **283**: 7721-7732
- MacNab GM, Alexander JJ, Lecatsas G, Bey EM, Urbanowicz JM (1976) Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *British journal of cancer* **34**: 509-515
- Maffrand JP, Lehner JP, Le Fur G (2002) [Design and birth of drugs]. *La Revue du praticien* **52**: 482-485
- Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ (2009) Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature cell biology* **11**: 1275-1276
- Mannervik B, Danielson UH (1988) Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* **23**: 283-337
- Marotta F, Vangieri B, Cecere A, Gattoni A (2004) The pathogenesis of hepatocellular carcinoma is multifactorial event. Novel immunological treatment in prospect. *Clin Ter* **155**: 187-199
- Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, Benitez C, Pons JA, Parrilla P, Ramirez P, Bruguera M, Rimola A, Sanchez-Fueyo A (2008) Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *The Journal of clinical investigation* **118**: 2845-2857
- Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nunzio F, Di Iorio E, Recchia A, Maruggi G, Ferrari G, Provasi E, Bonini C, Capurro S, Conti A, Magnoni C, Giannetti A, De Luca M (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature medicine* **12**: 1397-1402
- Mazzaferro V, Chun YS, Poon RT, Schwartz ME, Yao FY, Marsh JW, Bhoori S, Lee SG (2008) Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* **15**: 1001-1007
- McManaway ME, Neckers LM, Loke SL, al-Nasser AA, Redner RL, Shiramizu BT, Goldschmidt WL, Huber BE, Bhatia K, Magrath IT (1990) Tumour-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligodeoxynucleotide. *Lancet* **335**: 808-811
- Mercey E, Obeid P, Glaise D, Calvo-Munoz ML, Guguen-Guillouzo C, Fouque B (2010) The application of 3D micropatterning of agarose substrate for cell culture and in situ comet assays. *Biomaterials* **31**: 3156-3165
- Mescam M, Bezy-Wendling J, Kretowski M, Jurczuk K, Eliat PA, Olivie D (2007) Coupling texture analysis and physiological modeling for liver dynamic MRI interpretation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2007**: 4223-4226
- Mescam M, Kretowski M, Bezy-Wendling J (2010) Multiscale model of liver DCE-MRI towards a better understanding of tumor complexity. *IEEE Trans Med Imaging* **29**: 699-707
- Mesika A, Grigoreva I, Zohar M, Reich Z (2001) A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther* **3**: 653-657

- Mesika A, Kiss V, Brumfeld V, Ghosh G, Reich Z (2005) Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum Gene Ther* **16**: 200-208
- Mevel M, Montier T, Lamarche F, Delepine P, Le Gall T, Yaouanc JJ, Jaffres PA, Cartier D, Lehn P, Clement JC (2007) Dicationic lipophosphoramidates as DNA carriers. *Bioconjugate chemistry* **18**: 1604-1611
- Michalopoulos GK (2007) Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* **213**: 286-300
- Michalopoulos GK (2010) Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* **176**: 2-13
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science (New York, NY)* **276**: 60-66
- Midoux P, Breuzard G, Gomez JP, Pichon C (2008) Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Current gene therapy* **8**: 335-352
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic acids research* **21**: 871-878
- Midoux P, Pichon C, Yaouanc JJ, Jaffres PA (2009) Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British journal of pharmacology* **157**: 166-178
- Milano G, Mortier L, Digue L, Desmedt E, Ravaud A (2009) [Hand-foot syndrome and sorafenib]. *Bulletin du cancer* **96**: 191-197
- Mockey M, Bourseau E, Chandrashekar V, Chaudhuri A, Lafosse S, Le Cam E, Quesniaux VF, Ryffel B, Pichon C, Midoux P (2007) mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer gene therapy* **14**: 802-814
- Moncion A, Truong NT, Garrone A, Beaune P, Barouki R, De Waziers I (2002) Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin. *The Journal of biological chemistry* **277**: 45904-45910
- Montier T, Cavalier A, Delepine P, Guillaume C, Clement JC, Yaouanc JJ, Morel G, Thomas D, Ferec C (2003) The use of in situ hybridization to study the transgene pathway following cellular transfection with cationic phosphonolipids. *Blood cells, molecules & diseases* **30**: 112-123
- Montier T, Delepine P, Le Ny K, Fichou Y, Le Bris M, Hardy E, Picquet E, Clement JC, Yaouanc JJ, Ferec C (2004a) KLN-5: a safe monocationic lipophosphoramidate to transfect efficiently haematopoietic cell lines and human CD34+ cells. *Biochimica et biophysica acta* **1665**: 118-133
- Montier T, Delepine P, Marianowski R, Le Ny K, Le Bris M, Gillet D, Potard G, Mondine P, Frachon I, Yaouanc JJ, Clement JC, Des Abbayes H, Ferec C (2004b) CFTR transgene expression in primary DeltaF508 epithelial cell cultures from human nasal polyps following gene transfer with cationic phosphonolipids. *Molecular biotechnology* **26**: 193-206

- Moradpour D, Compagnon B, Wilson BE, Nicolau C, Wands JR (1995) Specific targeting of human hepatocellular carcinoma cells by immunoliposomes in vitro. *Hepatology (Baltimore, Md)* **22**: 1527-1537
- Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, Benoit JP, Passirani C (2010) Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* **31**: 321-329
- Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **29**: 3477-3496
- Moullier P, Salvetti A, Bohl D, Danos O, Heard JM (1996) [Gene therapy in lysosomal diseases]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* **190**: 45-51
- Muangmoonchai R, Wong SC, Smirlis D, Phillips IR, Shephardl EA (2002) Transfection of liver in vivo by biolistic particle delivery: its use in the investigation of cytochrome P450 gene regulation. *Molecular biotechnology* **20**: 145-151
- Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA (1991) Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer research* **51**: 1744-1748
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* **42**: 3858-3863
- Nguyen TH, Ferry N (2004) Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene therapy* **11 Suppl 1**: S76-84
- Nguyen TH, Loux N, Dagher I, Vons C, Carey K, Briand P, Hadchouel M, Franco D, Jouanneau J, Schwall R, Weber A (2003) Improved gene transfer selectivity to hepatocarcinoma cells by retrovirus vector displaying single-chain variable fragment antibody against c-Met. *Cancer gene therapy* **10**: 840-849
- Ni Y, Sonnabend J, Seitz S, Urban S (2010) The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *Journal of virology* **84**: 3879-3888
- Nicolas G, Vaulont S (2005) [Deciphering the action mechanism of hepcidin]. *Med Sci (Paris)* **21**: 7-9
- Niidome T, Huang L (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene therapy* **9**: 1647-1652
- Nishikawa M, Huang L (2001) Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**: 861-870
- Niwa H (2010) Mouse ES cell culture system as a model of development. *Development, growth & differentiation* **52**: 275-283
- Nizard P, Tetley S, Le Drean Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, Michel D (2007) Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **8**: 554-565
- Ogris M, Wagner E (2002) Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug discovery today* **7**: 479-485

- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science (New York, NY)* **303**: 644-649
- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz PL, Lopes C (2007) Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* **79**: 593-616
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature medicine* **12**: 401-409
- Otu HH, Naxerova K, Ho K, Can H, Nesbitt N, Libermann TA, Karp SJ (2007) Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *The Journal of biological chemistry* **282**: 11197-11204
- Oudrhiri N, Vigneron JP, Peuchmaur M, Leclerc T, Lehn JM, Lehn P (1997) Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1651-1656
- Ourlin JC, Jounaidi Y, Maurel P, Vilarem MJ (1997) Role of the liver-enriched transcription factors C/EBP alpha and DBP in the expression of human CYP3A4 and CYP3A7. *Journal of hepatology* **26 Suppl 2**: 54-62
- Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**: 1093-1102
- Pankhurst C, Jones, Dobson (2003) Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D* **36**: R167-R181
- Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 1286-1290
- Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M (2010) Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* **140**: 197-208
- Peng DJ, Sun J, Wang YZ, Tian J, Zhang YH, Noteborn MH, Qu S (2007) Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Cancer gene therapy* **14**: 66-73
- Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R (2006) The PITSLRE/CDK1p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO reports* **7**: 418-424
- Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, Weston A, Groopman JD, Shields PG, Vignaud JM, Juillerat M, Lipsky MM, Trump BF, et al. (1993) Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 5123-5127

- Pichon C, Goncalves C, Midoux P (2001) Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery. *Advanced drug delivery reviews* **53**: 75-94
- Picquet E, Le Ny K, Delepine P, Montier T, Yaouanc JJ, Cartier D, des Abbayes H, Ferec C, Clement JC (2005) Cationic lipophosphoramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in vivo DNA delivery. *Bioconjugate chemistry* **16**: 1051-1053
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O (2001) A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of biological chemistry* **276**: 7811-7819
- Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 264-269
- Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G (2007) Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **45**: 277-285
- Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR (1997) The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer* **33**: 1005-1016
- Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 7161-7165
- Raoul JL, Boucher E, Rolland Y, Garin E (2010) Treatment of hepatocellular carcinoma with intra-arterial injection of radionuclides. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**: 41-49
- Recchia F, Candeloro G, Guerriero G, Piazze J, Desideri G, Necozone S, Rea S (2010) Liposomal pegylated doxorubicin and oxaliplatin as salvage chemotherapy in patients with metastatic gastric cancer treated earlier. *Anti-cancer drugs* **21**: 559-564
- Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, Colonna M, Halna JM, Hedelin G, Mace-Lesec'h J, Peng J, Buemi A, Velten M, Jougla E, Arveux P, Le Bodic L, Michel E, Sauvage M, Schvartz C, Faivre J (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* **51**: 3-30
- Rivest V, Phivilay A, Julien C, Belanger S, Tremblay C, Emond V, Calon F (2007) Novel liposomal formulation for targeted gene delivery. *Pharmaceutical research* **24**: 981-990
- Rosenberg D, Ilic Z, Yin L, Sell S (2000) Proliferation of hepatic lineage cells of normal C57BL and interleukin-6 knockout mice after cocaine-induced periportal injury. *Hepatology (Baltimore, Md)* **31**: 948-955
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. (1990) Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *The New England journal of medicine* **323**: 570-578
- Rosmorduc O, Chevreau C, Dielenseger P, Ederhy S, Goldwasser F, Grange JD, Mortier L, Neidhardt-Berard ME, Robert C, Scotte F, Seitz JF (2010) [Guidelines for treatment of

hepatocellular or renal carcinoma with sorafenib.]. *Gastroenterologie clinique et biologique*

Rousseau B, Menard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemiere S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J (2007) Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* **46**: 1108-1118

Rychtrmoc D, Libra A, Buncek M, Garnol T, Cervinkova Z (2009) Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings? *Acta Medica (Hradec Kralove)* **52**: 91-99

Saad H, Belle R, Morales J, Cosson B, Mulner-Lorillon O, Berthou C, Cormier P (2007) [Initiation factors eIF4: from sea urchin embryonic development to chronic lymphocytic leukemia]. *Journal de la Societe de biologie* **201**: 307-315

Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y (2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* **24**: 245-250

Schulze A, Gripon P, Urban S (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology (Baltimore, Md)* **46**: 1759-1768

Seong J (2009) Challenge and hope in radiotherapy of hepatocellular carcinoma. *Yonsei Med J* **50**: 601-612

Serandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Theret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A (2005) TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* **41**: 478-486

Shakunthala N (2010) New cytochrome P450 mechanisms: implications for understanding molecular basis for drug toxicity at the level of the cytochrome. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**: 1-15

Sheweita SA, Tilmisany AK (2003) Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* **4**: 45-58

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **270**: 414-423

Simoes S, Filipe A, Faneca H, Mano M, Penacho N, Duzgunes N, de Lima MP (2005) Cationic liposomes for gene delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2**: 237-254

Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce EA, Mingozzi F, Bennicelli JL, Rossi S, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Redmond TM, Zhu X, Shindler KS, Ying GS, Ziviello C, Acerra C, Wright JF, McDonnell JW, High KA, Bennett J, Auricchio A (2010) Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* **18**: 643-650

Simpson GE, Finckh ES (1963) The Pattern of Regeneration of Rat Liver after Repeated Partial Hepatectomies. *J Pathol Bacteriol* **86**: 361-370

- Soler MN, Bobe P, Benihoud K, Lemaire G, Roos BA, Lausson S (2000) Gene therapy of rat medullary thyroid cancer by naked nitric oxide synthase II DNA injection. *The journal of gene medicine* **2**: 344-352
- Song IH (2009) Molecular targeting for treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* **15**: 299-308
- Soriano P, Dijkstra J, Legrand A, Spanjer H, Londos-Gagliardi D, Roerdink F, Scherphof G, Nicolau C (1983) Targeted and nontargeted liposomes for in vivo transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 7128-7131
- Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews* **8**: 473-480
- Stuver SO, Trichopoulos D (1994) Liver cancer. *Cancer Surv* **19-20**: 99-124
- Sun X, Hai L, Wu Y, Hu HY, Zhang ZR (2005) Targeted gene delivery to hepatoma cells using galactosylated liposome-polycation-DNA complexes (LPD). *Journal of drug targeting* **13**: 121-128
- Takayama E, Seki S, Ohkawa T, Ami K, Habu Y, Yamaguchi T, Tadakuma T, Hiraide H (2000) Mouse CD8+ CD122+ T cells with intermediate TCR increasing with age provide a source of early IFN-gamma production. *J Immunol* **164**: 5652-5658
- Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G (1999) The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol* **19**: 6003-6011
- Talwalkar JA, Gores GJ (2004) Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**: S126-132
- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R (2002) Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene therapy* **9**: 372-380
- Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 836-847
- Tep K, Korb V, Richard C, Escriou V, Largeau C, Vincourt V, Bessodes M, Guellier A, Scherman D, Cynober L, Chaumeil JC, Dumortier G (2009) Formulation and evaluation of ATP-containing liposomes including lactosylated ASGPr ligand. *J Liposome Res* **19**: 287-300
- Thenappan A, Li Y, Kitisin K, Rashid A, Shetty K, Johnson L, Mishra L (2009) Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*
- Thorgeirsson SS, Grisham JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **31**: 339-346
- Toutirais O, Cabillic F, Le Friec G, Salot S, Loyer P, Le Gallo M, Desille M, de La Pintiere CT, Daniel P, Bouet F, Catros V (2009) DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes

human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Eur J Immunol* **39**: 1361-1368

Tranchant I, Thompson B, Nicolazzi C, Mignet N, Scherman D (2004) Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *The journal of gene medicine* **6 Suppl 1**: S24-35

Trinchet JC, Ganne-Carrie N (2006) [Should we screen for hepatocellular carcinoma?]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **30**: 880-886

Truong NT, Moncion A, Barouki R, Beaune P, de Waziers I (2005) Regulatory sequence responsible for insulin destabilization of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) mRNA. *The Biochemical journal* **388**: 227-235

Vaha-Koskela MJ, Heikkila JE, Hinkkanen AE (2007) Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer letters* **254**: 178-216

Van Thiel DH, Gavaler JS, Kam I, Francavilla A, Polimeno L, Schade RR, Smith J, Diven W, Penkrot RJ, Starzl TE (1987) Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* **93**: 1414-1419

Visone R, Petrocca F, Croce CM (2008) Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease. *Gastroenterology* **135**: 1866-1869

Vivien O, Vigneron, Hauchecorne, Ramasawmy, Riquier, Toury, Fabrega, Navarro, Lehn, Lehn (1999) Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes : état actuel et perspectives. *Annales de l'institut Pasteur / Act* **10**: 301-312

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML (1990) Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 3410-3414

Wagstaff KM, Jans DA (2007) Nucleocytoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene transfer. *The Biochemical journal* **406**: 185-202

Walsh G (2005) Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends in biotechnology* **23**: 553-558

Wang SL, Yu FB, Jiang TY, Sun CS, Wang T, Zhang JH (2008) Design and synthesis of novel galactosylated polymers for liposomes as gene drug carriers targeting the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Journal of drug targeting* **16**: 233-242

Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M (2003) The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 1**: 11881-11888

Wangerek LA, Dahl HH, Senden TJ, Carlin JB, Jans DA, Dunstan DE, Ioannou PA, Williamson R, Forrest SM (2001) Atomic force microscopy imaging of DNA-cationic liposome complexes optimised for gene transfection into neuronal cells. *The journal of gene medicine* **3**: 72-81

Warren P, Song W, Holle E, Holmes L, Wei Y, Li J, Wagner T, Yu X (2002) Combined HSV-TK/GCV and secondary lymphoid tissue chemokine gene therapy inhibits tumor growth and elicits potent antitumor CTL response in tumor-bearing mice. *Anticancer research* **22**: 599-604

- Webber EM, Godowski PJ, Fausto N (1994) In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology (Baltimore, Md)* **19**: 489-497
- Wolff AC, Wang M, Li H, Pins MR, Pretorius FJ, Rowland KM, Sparano JA, Davidson NE (2010) Phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin plus docetaxel with and without trastuzumab in metastatic breast cancer: Eastern Cooperative Oncology Group trial E3198. *Breast cancer research and treatment* **121**: 111-120
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, NY)* **247**: 1465-1468
- Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S (2003) Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nature biotechnology* **21**: 885-890
- Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y (1996) Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharmaceutical research* **13**: 497-513
- Yaroslavov AA, Kuchenkova OY, Okuneva IB, Melik-Nubarov NS, Kozlova NO, Lobyshev VI, Menger FM, Kabanov VA (2003) Effect of polylysine on transformations and permeability of negative vesicular membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1611**: 44-54
- Yatvin MB, Kreutz W, Horwitz BA, Shinitzky M (1980) pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science (New York, NY)* **210**: 1253-1255
- Zeira E, Manevitch A, Khatchatouriants A, Pappo O, Hyam E, Darash-Yahana M, Tavor E, Honigman A, Lewis A, Galun E (2003) Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression. *Mol Ther* **8**: 342-350
- Zeira E, Manevitch A, Manevitch Z, Kedar E, Gropp M, Daudi N, Barsuk R, Harati M, Yotvat H, Troilo PJ, Griffiths TG, 2nd, Pacchione SJ, Roden DF, Niu Z, Nussbaum O, Zamir G, Papo O, Hemo I, Lewis A, Galun E (2007) Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. *Faseb J* **21**: 3522-3533
- Zelphati O, Szoka FC, Jr. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11493-11498
- Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA (2001) Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **12**: 427-438
- Zheng ZY, Weng SY, Yu Y (2009) Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol* **15**: 5776-5783
- Zhou J, Wang Z, Qiu SJ, Huang XW, Sun J, Gu W, Fan J (2010) Surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: comparison of resection and liver transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol*
- Zimmermann A (2004) Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* **19 Suppl 4**: iv6-10



ANNEXES

« C'est ainsi que naissent les grandes inventions : par le contact inopiné de deux produits posés par hasard, l'un à côté de l'autre, sur une paillasse de laboratoire ».
Jean Echenoz, Extrait de « Je m'en vais »

Annexe 1.

Interactions cytochromes P450 et xénobiotiques

Substrats

1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4,5,7
amitriptyline caffeine clomipramine clozapine cyclobenzaprine estradiol fluvoxamine haloperidol imipramine N-DeMe mexilétine naproxen olanzapine ondansetron phenacetin_ acetaminophen_NAPQI propranolol riluzole ropivacaine tacrine theophylline tizanidine verapamil (R)warfarin zileuton zolmitriptan	bupropion cyclophosphamide efavirenz ifosfamide methadone	paclitaxel torsemide amodiaquine cerivastatin repaglinide	NSAIDs: diclofenac ibuprofen lornoxicam meloxicam S- naproxen_Nor piroxicam suprofen Oral Hypoglycemic Agents: tolbutamide glipizide Angiotensin II Blockers: losartan irbesartan Sulfonylureas: glyburide glibenclamide glipizide glimepiride tolbutamide amitriptyline celecoxib fluoxetine fluvastatin glyburide nateglinide phenytoin-4- OH2 rosiglitazone tamoxifen torsemide S-warfarin	Proton Pump Inhibitors: lansoprazole omeprazole pantoprazole rabeprazole Anti-epileptics: diazepam_Nor phenytoin(O) S-mephenytoin phenobarbitone amitriptyline carisoprodol citalopram chloramphenicol clomipramine cyclophosphamide hexobarbital imipramine N- DeMe indomethacin R-mephobarbital moclobemide nelfinavir nilutamide primidone progesterone proguanil propranolol teniposide R-warfarin_8-OH	Beta Blockers: carvedilol S-metoprolol propafenone timolol Antidepressants: amitriptyline clomipramine desipramine imipramine paroxetine Antipsychotics: haloperidol perphenazine risperidone_9OH thioridazine zuclopenthixol alprenolol amphetamine aripiprazole atomoxetine bufuralol chlorpheniramine chlorpromazine codeine (_O-desMe) debrisoquine dexfenfluramine dextromethorphan duloxetine encainide flecainide fluoxetine fluvoxamine lidocaine metoclopramide methoxyamphetamine mexilétine minaprine nebivolol nortriptyline ondansetron oxycodone perhexiline phenacetin phenformin promethazine propranolol sparteine tamoxifen tramadol venlafaxine	Anesthetics: enflurane halothane isoflurane methoxyflurane sevoflurane acetaminophen_ NAPQI aniline2 benzene chlorzoxazone ethanol N,N-dimethyl formamide theophylline_ 8-OH	Macrolide antibiotics: clarithromycin erythromycin (not 3A5) NOT azithromycin telithromycin Anti-arrhythmics: quinidine_3OH (not 3A5) Benzodiazepines: alprazolam diazepam_3OH midazolam triazolam Immune Modulators: cyclosporine tacrolimus (FK506) HIV Antivirals: indinavir nelfinavir ritonavir saquinavir Prokinetic: cisapride Antihistamines: astemizole chlorpheniramine terfenadine Calcium Channel Blockers: amlodipine diltiazem felodipine lercanidipine nifedipine2 nisoldipine nitrendipine verapamil HMG CoA Reductase Inhibitors: atorvastatin cerivastatin lovastatin NOT pravastatin simvastatin Steroid 6beta-OH: estradiol hydrocortisone progesterone testosterone Miscellaneous: alfentanil aprepitant aripiprazole buspirone cafergot caffeine_TMU cilostazol cocaine codeine- Ndemethylation dapson dexamethasone dextromethorphan docetaxel domperidone eplerenone fentanyl finasteride gleevec haloperidol irinotecan LAAM lidocaine methadone nateglinide ondansetron pimozone propranolol quetiapine quinine risperidone NOT rosuvastatin salmeterol sildenafil sirolimus tamoxifen taxol terfenadine trazodone vincristine zaleplon ziprasidone zolpidem

Inhibiteurs

1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4,5,7
fluvoxamine ciprofloxacin cimetidine amiodarone fluoroquinolones furafylline interferon methoxsalen mibefradil	thiotepa ticlopidine	gemfibrozil trimethoprim glitazones montelukast quercetin	fluconazole amiodarone fenofibrate fluvastatin fluvoxamine isoniazid lovastatin phenylbutazone probenicid sertraline sulfamethoxazole sulfaphenazole teniposide voriconazole zafirlukast	PPIs: lansoprazole omeprazole pantoprazole rabeprazole chloramphenicol cimetidine felbamate fluoxetine fluvoxamine indomethacin ketoconazole modafinil oxcarbazepine probenicid ticlopidine topiramate	bupropion fluoxetine paroxetine quinidine duloxetine terbinafine amiodarone cimetidine sertraline celecoxib chlorpheniramine chlorpromazine citalopram clemastine clomipramine cocaine diphenhydramine doxepin doxorubicin escitalopram halofantrine histamine H1 receptor antagonists hydroxyzine levomepromazine methadone metoclopramide mibefradil midodrine moclobemide perphenazine ranitidine red-haloperidol ritonavir ticlopidine tripelennamine	diethyldithiocarbamate disulfiram	HIV Antivirals: indinavir nelfinavir ritonavir clarithromycin itraconazole ketoconazole nefazodone saquinavir telithromycin aprepitant erythromycin fluconazole grapefruit juice verapamil diltiazem cimetidine amiodarone NOT azithromycin chloramphenicol ciprofloxacin delavirdine diethyldithiocarbamate fluvoxamine gestodene imatinib mibefradil mifepristone norfloxacin norfluoxetine star fruit voriconazole

Inducteurs

1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4,5,7
broccoli brussel sprouts char-grilled meat insulin methylcholanthrene modafinil nafcillin beta-naphthoflavone omeprazole tobacco	phenobarbital rifampin	rifampin	rifampin secobarbital	carbamazepine norethindrone NOT pentobarbital prednisone rifampin	dexamethasone rifampin	ethanol isoniazid	HIV Antivirals: efavirenz nevirapine barbiturates carbamazepine efavirenz glucocorticoids modafinil nevirapine oxcarbazepine phenobarbital phenytoin pioglitazone rifabutin rifampin St. John's wort troglitazone

D'après Flockhart DA. Drug Interactions : Cytochrome P450 Drug Interaction Table.
<http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp> ou www.drug-interactions.com

Annexe 2. Classifications du CHC

Les classifications de prédiction de survie du carcinome hépatocellulaire

Le pronostic du CHC est dans l'ensemble sombre, dépendant du stade de découverte et de la gravité de la cirrhose. De nombreux auteurs (Dilou, 2004) ont cherché à établir des classifications pronostiques qui ont pour objectifs d'évaluer le pronostic initial et la sélection des patients pouvant bénéficier d'un traitement à visée curative susceptible d'améliorer leur survie. Enfin, dans le cadre des essais thérapeutiques, elles permettent en prédisant la survie spontanée, l'inclusion de groupes de patients homogènes et ainsi d'éviter des biais de sélection.

Des degrés de différenciations sont utilisés pour classer les tumeurs. Ce degré varie selon le patient et aussi la zone du foie concerné. Il existe plusieurs types de classification. L'une des plus utilisées est la **classification d'Edmonson Steiner** qui divise le carcinome hépatocellulaire en quatre degrés de différenciation (Edmonson et Steiner, 1954). Le CHC bien différencié (grade I/II) est très souvent retrouvé à de stades précoces de la maladie et très rarement à des stades avancés. Il se caractérise par des hépatocytes plus petits que la normale présentant un rapport noyau/cytoplasme augmenté et une densité cellulaire importante. Ce profil est spécifique des petits CHC (moins de 2 cm). Le CHC moyennement différencié (grade II/III) : Profil le plus souvent rencontré à des stades avancés de CHC, il se caractérise par un cytoplasme hépatocytaire très éosinophile. Des structures pseudoglandulaires sont parfois retrouvées ainsi que de la bile. Et finalement le CHC peu différencié (grade III/IV). Il se caractérise par un profil compact tumoral, un cytoplasme peu visible. Il est très difficile de diagnostiquer un CHC peu différencié.

La **classification de Child-Plugh** a été élaborée en 1973 pour apprécier la survie des malades ayant une hémorragie digestive par rupture de varices oesophagiennes. Elle est basée sur la présence ou non d'une encéphalopathie, sur l'existence d'une ascite, la bilirubinémie, le taux de prothrombine et l'albuminémie. Mais, elle ne tient compte que de la **fonction hépatique**. Elle permet principalement de sélectionner des patients avec un mauvais pronostic (stade Child-Pugh C) et est nettement moins discriminative que la classification de CLIP.

Variables	Sévérité	Score
Encéphalopathie	Absente	1
	Modérée I-II	2
	Importante III-IV	3
Ascite	Absente	1
	Modérée	2
	Importante	3
Bilirubinémie (µmol/litre)	< 34	1
	34 à 51	2
	> 51	3
Albuminémie (g/L)	> 35	1
	28 à 35	2
	< 28	3
Taux de prothrombine	> 50 %	1
	40 à 50 %	2
	< 40 %	3

A = 5-6, B = 7-9, C = 10-15.

La **classification d'Okuda** établie en 1985 à partir de 850 cas de CHC, a étudié la valeur pronostique des facteurs suivants : le volume tumoral, la présence d'ascite, la bilirubinémie et l'albuminémie. La cohorte avait une médiane de survie globale de 4,1 mois. Une résection chirurgicale a été effectuée chez 18,5 % des malades. Les auteurs ont montré des médianes de survie statistiquement différentes entre le stade I (11,5 mois), le stade II (3 mois) et le stade III (0,9 mois). Mais, les études récentes (CLIP ; Chevret ; Leung ; Levy, 2002) la comparant aux classifications de CLIP, de GRETCH et de CUPPI ont montré qu'elle avait une capacité de discrimination nettement inférieure. Elle permet surtout de définir le groupe de patients possédant un **mauvais pronostic** (stade Okuda III), car elle n'inclut pas des facteurs tel que le caractère uni ou multinodulaire de la tumeur, l'existence d'une thrombose porte ou de métastases et le taux d'alpha-fœtoprotéine. De plus, l'évaluation du volume tumoral est le plus souvent effectuée de façon subjective. Du fait du dépistage effectué chez les malades cirrhotiques, de plus en plus de petites tumeurs sont découvertes. Or, cette classification, en incluant comme paramètre un volume tumoral inférieur ou supérieur à 50 %, ne permet pas la distinction de ces malades au pronostic plus favorable.

Variables	0 point	1 point
Taille de la tumeur	< 50 % du volume du foie	≥ 50 % du volume du foie
Ascite	Absente	Présente
Albuminémie	≥ 30 g/L	< 30g/L
Bilirubinémie	< 50 µmol/L	≥ 50 µmol/L

Stade I = 0 point, Stade II = 1 ou 2 points, Stade III = 3 ou 4 points

La **classification TNM** (ne tient compte que des **caractéristiques tumorales**. L'évaluation de la taille tumorale (T1 à T4) est basée sur le nombre et la localisation des nodules, la taille du plus grand nodule et la présence d'une invasion soit vasculaire, soit d'un organe de voisinage. Les critères pour le statut ganglionnaire et métastatique (N et M) sont identiques à ceux des autres tumeurs solides. Mais, la classification TNM a une moindre efficacité pour distinguer les malades par rapport aux classifications de CLIP, d'Okuda et même de Child-Pugh. De même, lors d'une résection chirurgicale du CHC, il

n'y a pas de différence significative entre les malades stade 1 et stade 2 ainsi qu'entre les malades stade 3 et stade 4A (Vauthey, 2002). Les résultats sont similaires chez les malades transplantés (Iwatsuki ; Llovet ; Marsh) et la classification TNM ne peut prédire la récurrence tumorale (Iwatsuki). La classification TNM actuelle ne paraît pas appropriée pour évaluer la survie de malades porteurs d'un CHC traité par résection chirurgicale ou transplantation car elle ne tient pas compte de la fonction hépatique du malade.

Stade AJCC/TNM	
T1	Nodule unique < 2 cm, pas d'invasion vasculaire
T2	
a	Unique < 2 cm avec invasion vasculaire
b	Multiples nodules unilobulaires < 2 cm sans invasion vasculaire
c	Unique > 2 cm sans invasion vasculaire
T3	
a	Unique > 2 cm avec invasion vasculaire
b	Multiples unilobulaires < 2 cm avec invasion vasculaire
c	Multiples unilobulaires > 2 cm sans ou avec invasion vasculaire
T4	
a	Multiples nodules bilobulaires
b	Invasion vasculaire d'un gros vaisseau (porte ou hépatique)
c	Invasion d'un organe adjacent
Stade I	T1N0M0
Stade II	T2N0M0
Stade III	T1, T2 ou T3 N+M0
Stade IV	T4 ou M+

La **classification CLIP** (Cancer of the Liver Italian Program, CLIP) a été réalisée en procédant à l'analyse rétrospective des facteurs influençant la survie de 435 patients porteurs d'un CHC diagnostiqué de 1990 à 1992. Si 247 malades ont eu un traitement locorégional, seulement 12 ont bénéficié d'une résection chirurgicale. En analyse multivariée, les facteurs indépendants prédictifs de la survie étaient le stade de Child-Pugh, la morphologie et l'extension tumorales, le taux d'alpha-fœtoprotéine et la présence d'une thrombose portale. Cette classification a été validée de façon interne et également au cours de plusieurs études prospectives (Leung, 2002 ; Llovet, 2000 ; Zhao, 2002 ; Ueno, 2001). Elle semble plus apte à distinguer les malades à un **stade précoce**. Une des variables utilisées dans la classification est le volume tumoral qui n'est pas souvent déterminé de façon objective en pratique courante.

Variables	0	1	2
Classe de Child-Pugh	A	B	C
Morphologie tumorale	Nodule unique et < 50 %	Nodules multiples et < 50 %	Massif ou ≥ 50 %
AFP (g/L)	< 400	≥ 400	
Thrombose portale	Non	Oui	

La **classification BCLC** (Barcelona Clinic Liver Cancer Group)(Llovet, 1999) est basée sur plusieurs études montrant que les malades possédant la meilleure survie sont ceux pouvant bénéficier d'un traitement à visée curative (résection chirurgicale, transplantation, alcoolisation, radiofréquence). Par contre la survie après un traitement à visée curative, chez des malades correctement sélectionnés atteint 50 à 75 % à 5 ans (Llovet, 1999). Elle est d'**utilisation facile** et propose un **algorithme de traitement correspondant aux différents stades**. Cependant, les patients stade Child-Pugh C porteurs de petits CHC peuvent être candidats à un traitement curatif par

transplantation, ce qui n'apparaît pas dans la classification actuelle où ils sont placés dans le stade C. Elle n'a pas été validée dans des études prospectives indépendantes.

Stade	Performance status	Morphologie tumorale	Okuda	Fonction hépatique
A : stade précoce				
A1	0	Unique, < 5 cm	I	Pas d'HTP et bilirubine N
A2	0	Unique, < 5 cm	I	HTP, bilirubine N
A3	0	Unique, < 5 cm	I	HTP, hyperbilirubinémie
A4	0	3 tumeurs, < 3 cm	I-II	Child-Pugh A-B
B : stade intermédiaire	0	Multinodulaire	I-II	Child-Pugh A-B
C : stade évolué	1-2	Invasion vasculaire Métastases	I-II	Child-Pugh A-B
D : stade terminal	3-4	Indifférente	III	Child-Pugh C

Stade A et B : tous les critères doivent être remplis, Stade C et D : un seul critère suffit.
 http = hypertension portale.

La **classification GRETCH** (Groupe d'Étude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire)(Chevret et al., 1999) a été construite grâce à l'étude rétrospective de 761 malades issus de 24 centres européens et canadiens de 1990 à 1992. Les malades transplantés ont été exclus. La survie médiane était de 4,3 mois. Un traitement a été effectué chez 360 patients dont 56 (7,3 %) ont pu bénéficier d'une résection chirurgicale. Les facteurs pronostiques retrouvés en analyse multivariée étaient l'indice de Karnofsky, la bilirubinémie, l'activité des phosphatases alcalines, l'alpha-foetoprotéine et l'existence d'une thrombose portale. Trois groupes de malades étaient ainsi définis avec des taux de survie à un an de 72, 34 et 7 % respectivement.

Variables	0	1	2	3
Index de Karnofsky	> 80 %			≤ 80 %
Bilirubinémie (μmol/L)	< 50			≥ 50
Phosphatases alcaline	< 2N		≥ 2N	
AFP (μg/L)	< 35		≥ 35	
Thrombose portale	Non		Oui	

Groupe A : score 0, Groupe B : score 1 à 5, Groupe C : score 6 à 11.

La **classification CUPI** (Chinese University Prognostic Index)(Leung, 2002) a été établie sur la base des données issues de l'étude de 926 malades chinois porteurs d'un CHC diagnostiqué de 1996 à 1998. L'AgHBs était détecté chez 79 % des malades ce qui représente un taux nettement plus important que dans les études occidentales. Un traitement chirurgical a été effectué chez 10,4% des malades et un traitement non chirurgical chez 31,2 %. La médiane de survie était de 4,4 mois. L'analyse multivariée a permis de retenir six facteurs pronostiques de survie : la classification TNM, la bilirubinémie, la présence d'ascite, le taux d'alpha-foetoprotéine et de phosphatases alcalines et la présence de symptômes au diagnostic. Une pondération a été attribuée à chaque facteur permettant ainsi le calcul d'un index pronostique s'échelonnant de -7 à 12. Trois groupes de malades avec une médiane de survie différente ont été définis : de -7 à 1 pour le groupe avec un bon pronostic, de 2 à 7 pour le groupe au pronostic intermédiaire et de 8 à 12 pour le groupe avec un mauvais pronostic.

Variable	Pondération (CUPI score)
Stade TNM	
I et II	- 3
III	- 1
IV	0
Absence de symptôme	- 4
Ascite	3
AFP	2
Bilirubine ($\mu\text{mol/l}$)	
< 34	0
34-51	3
> 51	4
Phosphatases alcalines ≥ 200 UI/l	3

Score de CUPI = somme des points de chaque variable.

Groupe de bon pronostic : - 7 à 1, Groupe de pronostic intermédiaire : 2 à 7, Groupe de mauvais pronostic : 8 à 12.

Les **classifications GRETCH et CUPI** n'ont pas fait l'objet d'études de validation indépendantes. Les populations utilisées pour leur élaboration ont des médianes de survie nettement inférieures à celles du groupe CLIP. La classification **GRETCH** a été comparée à la classification d'Okuda et elle permet d'isoler un groupe de malades avec un **meilleur pronostic** (stade A) alors que la **classification d'Okuda** était plus apte à distinguer les malades avec un **mauvais pronostic**. La classification CUPI a été comparée à la classification CLIP et d'Okuda et les auteurs ont conclu à une meilleure capacité discriminative de leur index.

Références

A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients : the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28: 751-5.

Cancer IUA. TNM classification of malignant tumours. 5th ed. N-Y: Wiley-Liss, 1997.

Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J. Hepatol.* 1999. 31:133-141.

Dilou N, Patouillard B, Audigier JC. Les classifications de prédiction de survie du carcinome hépatocellulaire. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2004. 28(4):359-366.

Edmonson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954. 7(3):462-503.

Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000. 89:2266-73.

Iwatsuki S, Dvorchik I, Marsh JW, Madariaga JR, Carr B, Fung JJ, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma : a proposal of a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg*. 2000. 191:389-94.

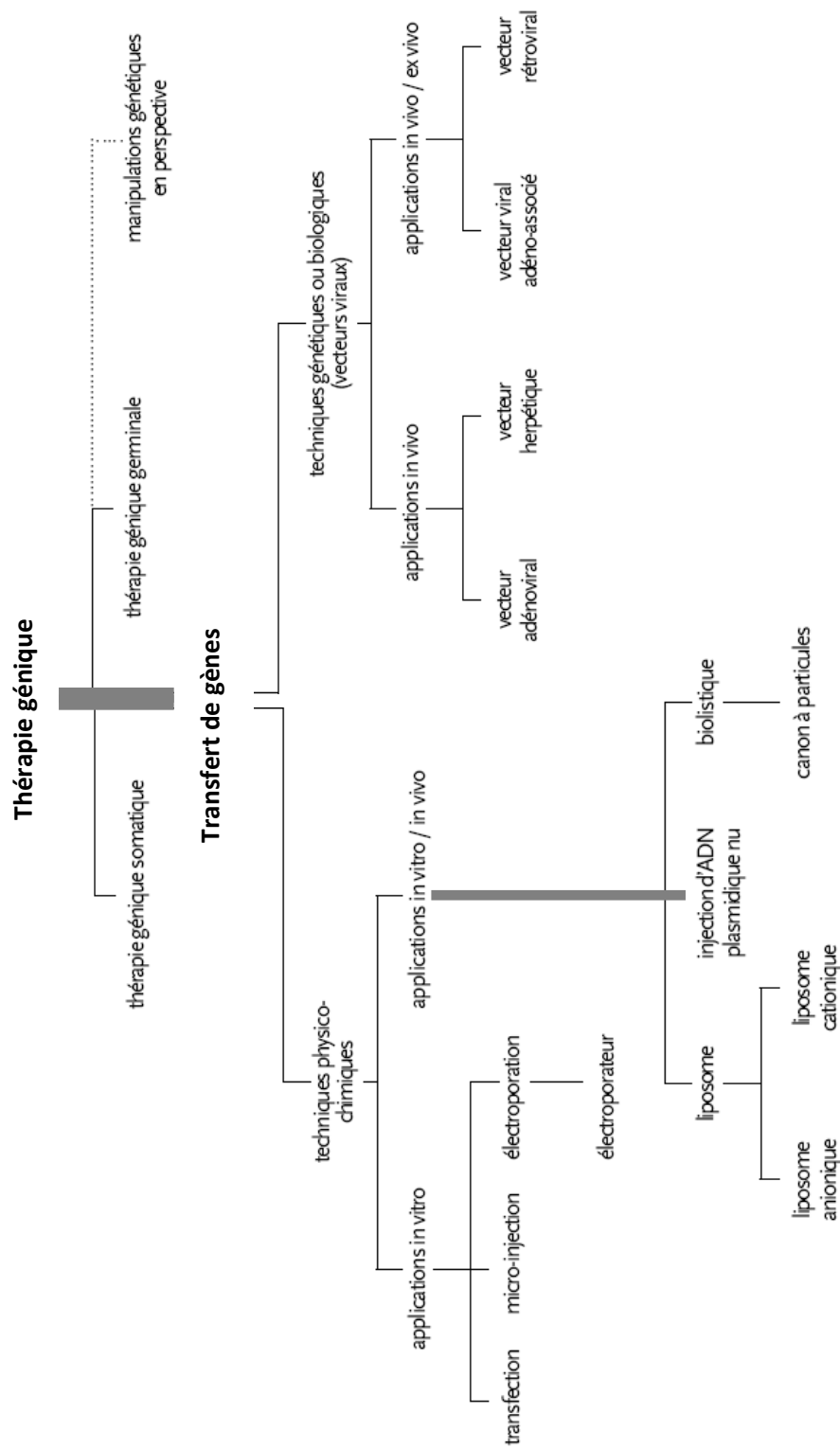
Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system: a study based on 926 patients. *Cancer*. 2002. 94:1760-9.

Levy I, Scherman M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Plugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut*. 2002. 50:881-5.

Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, et al. Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. *Hepatology*. 1998. 27:1572-7.

- Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognostic of hepatocellular carcinoma: the BCBL staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999.19:329-38.
- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology.* 1999. 30:1434-40.
- Llovet JM, Bruix J. Prospective validation of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2000. 32:679-80.
- Marsh JW, Dvorchik I, Bonham CA, Iwatsuki S. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome? *Cancer.* 2000. 88:538-43.
- Murray-Lyon IM, Pugh RN, Nunnerley HB, Laws JW, Dawson JL, Williams R. Treatment of bleeding oesophageal varices by infusion of vasopressin into the superior mesenteric artery. *Gut.* 1973. 14:59-63.
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer.* 1985. 56:918-28.
- Ueno S, Tanabe G, Sako K, Hiwaki T, Hokotate H, Fukukura Y, et al. Discrimination value of the new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Cancer of the Liver Italian Program. Hepatology.* 2001. 34:529-34.
- Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002. 20:1527-36.
- Zhao WH, Ma ZM, Zhou XR, Feng YZ, Fang BS. Prediction of recurrence and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after resection by use of CLIP score. *World J Gastroenterol.* 2002. 8:237-42.

Annexe 3. Glossaire de la transgénèse



D'après Bitar . Terminologie de la thérapie génique, 2001.

Annexe 4. Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux et leurs applications

Vecteur	Description	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus (ARN)	<p>ARN transcrit dans le cytoplasme en ADN</p> <p>Utilisés ex-vivo avec traitement mitogènes</p> <p>Titre élevé 10^9/ml</p> <p>Premiers vecteurs dérivés du MLV</p>	<p>Premiers utilisés en recherche et en essais cliniques</p> <p>Expression à long terme : transduction stable (intégration dans le génome)</p>	<p>N'infectent que les cellules en division : mitose nécessaire pour pénétrer dans le noyau</p> <p>Intégration non contrôlée dans le génome hôte</p> <p>Nécessité d'une petite taille de l'élément à insérer</p> <p>Dérive génétique au cours des cycles d'infection</p> <p>Risque de réveil des HERV par complémentation par les vecteurs rétroviraux</p> <p>Faible efficacité in vivo</p>
Lentivirus (ARN)	<p>Rétrovirus dérivé du HIV</p> <p>Traitement de la maladie de Parkinson</p> <p>Applications directes sur le foie et les muscles</p>	<p>Infectent les cellules quiescentes : efficaces in vivo</p> <p>Expression à long terme : intégration dans le génome</p> <p>Optimisation : vecteurs auto-inactivants</p>	<p>Immunogènes : génération accidentelle de HIV possible</p> <p>Difficiles à produire en grande quantité</p>
Adénovirus (ADNdb)	<p>ADNdb, qui reste en position épisomale</p> <p>Utilisés pour la mucoviscidose (tropisme pour l'épithélium respiratoire)</p> <p>Titre élevé : 10^{13}/ml</p>	<p>Infectent les cellules quiescentes et post-mitotiques</p> <p>Très forte efficacité de transfection dans beaucoup de tissus</p>	<p>Expression transitoire du gène car épisomique : pas d'intégration</p> <p>Forte immunogénicité, réduite en limitant les gènes viraux</p>
Virus associés aux adénovirus (AAV) (ADNsb)	<p>ADNsb</p> <p>Nécessairement associés aux adénovirus pour l'encapsulation</p>	<p>Infectent les cellules quiescentes</p> <p>Non immunogènes</p> <p>Transduction stable</p> <p>Titre élevé : 10^{14}/ml</p>	<p>Taille limitée du gène (5 kb)</p> <p>Certains types cellulaires peu infectables</p>
Herpes simplex virus HSV-1 (ADNdb)	<p>ADN db devenant circulaire dans le noyau</p> <p>Infection rétrograde des neurones à partir des boutons synaptiques.</p>	<p>Large capacité (40 kb)</p> <p>Transfectent les cellules en division ou non</p>	<p>Tropisme naturel pour les neurones</p> <p>Immunogène</p>

D'après (Ferry 2003)(Thèse Leblond, 2005)

MLV : Murine Leukemia Virus = Virus de la leucémie murine ;

HERV : Human Endogenous RetroVirus = Rétrovirus endogène humain

HIV : Human Immunodeficiency Virus = Virus d'Immunodéficience Humaine (**VIH**)

db : Double brin ; **sb** : Simple brin

Ferry, N. (2003). "[Gene therapy and liver diseases]." *Gastroenterol Clin Biol* **27**(3 Pt 1): 288-90.

Annexe 5. Microporator

Microporator MP100 LABTECH France

La microporation, une nouvelle technologie d'électroporation développée par *Digital Bio Technology*, est une méthode non-virale basée sur l'utilisation d'une pipette portant un cône comme espace d'électroporation, pour délivrer avec succès l'ADN, l'ARN ou la protéine dans les cellules ciblées.



L'appareil utilisé, le microporateur, est un générateur de haute performance à ondes pulsées rectangulaires, paramétrables, permettant l'envoi d'un champ électrique sur des cellules. Le choc envoyé modifie alors leur potentiel membranaire, et forme transitoirement des pores nécessaires au transfert d'ADN du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

Propriétés :

- La cuvette d'électroporation classique est remplacée par un cône.
- Les électrodes, classiquement en aluminium, sont ici en platine et au format capillaire (diamètre plus petit qu'une cuvette classique, mais distance entre électrodes augmentée : 3cm).
- 10µl ou 100µl de volume d'échantillonnage
- Transfection simple de tous types cellulaires eucaryotes, sauf les levures : lignées cellulaires mammaliennes, cultures primaires, cellules en suspension.

Avantages :

- Grande viabilité cellulaire : minimise la génération de chaleur (espace d'électroporation de 10µl), la formation d'oxydes, les changements locaux de pH, et assure la formation d'un champ électrique uniforme.
- Grande efficacité de transfection.
- Transfection aseptique dans les cônes de microporation stériles et jetables.
- Rapide et facile, accélère les analyses : l'ouverture et la fermeture de la cuvette, le remplissage de l'échantillon, la manipulation du support de la cuvette, et le retrait de l'échantillon de la cuvette ne sont plus nécessaires.
- Moins coûteux que l'électroporation classique.

Paramètres :

- Physico-chimiques : température, composition du tampon.
- Electriques : force du champ électrique, temps du choc, nombre de chocs.

Applications :

Transfection de gènes rapporteurs, de protéines, RNA interférence (siRNA)...

Annexe 6.

Essais cliniques de thérapie génique du cancer

Indication	Gène(s)	Vecteur	Injection	Responsable	Phase
Liver Metastases					
Liver metastases	HSV-TK	Adenovirus	Intratumoral	M.W. Sung (USA)	I
Colon cancer, Liver metastases	p53	Adenovirus	Intrahepatic	A. P. Venook (USA)	I
Colorectal cancer patients undergoing surgery for resectable liver metastases	Oncofoetal antigen 5T4	Poxvirus		UK	II
Hepatic Metastases from Colorectal Cancer	HSV-TK	Adenovirus	Intratumoral	M.W. Sung (USA)	I
Colorectal Carcinoma with Liver Metastasis	IFN-beta	Adenovirus	Intravenous	T. Reid (USA)	I/II
Colon Carcinoma (Hepatic Metastasis)	NV1020	Herpes simplex virus	Intrahepatic artery	Y. Fong (USA)	I
Metastatic Cancer					
Metastatic cancer	IL-2		Intratumoral	R. Herrmann (Switzerland)	I/II
Advanced Metastatic Cancer	Fas-TNF Receptor Chimera Transgene	Adenovirus	Intravenous	P.L. Triozzi (USA)	
Cancer / Digestive Cancer					
Unresectable or advanced cancer	CEA	Poxvirus	Intramuscular	J. L. Marshall (USA)	I/II
Cancer after failed standard therapy	IL-2	Naked/Plas mid DNA	Intratumoral	R. E. Sobol (USA)	I
Advanced cancers (various)	Antisense DNA to human X-linked inhibitor of apoptosis	Naked/Plas mid DNA		Christie hospital Manchester (UK)	I
Cancer immunotherapy	MAGE-1 MAGE-3	Poxvirus	Subcutaneous	Lienard (Switzerland)	I
Gastrointestinal cancer/malignant cancer ascites	p53	Adenovirus		Stewart (UK)	I
Unresectable digestive cancer	IL-2	Adenovirus		F. N. Gilly (France)	I/II
Carcinomas					
Carcinoma	CAP-1 peptide from CEA	Naked/Plas mid DNA		C.Ottensmeier (UK)	I/II
Metastatic carcinoma	p53	Adenovirus		UK	I
MUC1 Expressing Carcinoma	MUC-1	Naked/Plas mid DNA	Intramuscular	D. E. Avigan (USA)	I

CEA- Expressing Carcinomas					
CEA-Expressing Carcinoma	CEA	Saccharo-mycetes cerevisiae	Subcutaneous	J. L. Gulley (USA)	I
CEA Expressing Cancers/Liver Metastasis	CEA B7.1 (CD80) ICAM-1 LFA-3	Poxvirus	Subcutaneous	J. Gulley (USA)	I
CEA positive tumours	CEA CD3	Retrovirus		UK	I
Tumours					
Tumors	HLA-B7/Beta 2-Microglobulin	Lipofection	Intratumoral	G. J. Nabel (USA)	I
Solid Tumors	GM-CSF	Vaccinia virus		Radcliffe infirmary Oxford (UK)	I
	TNF	Adenovirus	Intratumoral	J. Desai Jhaveri (USA)	I
	hTERT	Adenovirus	Intramuscular	L.H. Camacho (USA)	I
	GM-CSF TGF-2 antisense	Naked/Plas mid DNA	Intradermal	J.R. Olivares (USA)	I
Refractory Solid Tumors	GM-CSF	Vaccinia virus	Intravenous	J. Burke (USA)	I
Superficial solid tumors	IL-2	Poxvirus	Intratumoral	F. Lejeune (Switzerland)	I/II
Advanced Solid Tumors	IL-12	Adenovirus	Intratumoral	S.J. Antonia (USA)	I
Digestive tumors (liver, pancreas and colorectal)	IL-12	Adenovirus	Intratumoral	I. Melero (Spain)	I
Advanced Solid Malignancies	PRAME and PSMA (Antigen)	Naked/Plas mid DNA	Intralymphodal	J. Weber (USA)	I

Suicide : HSV-TK: Herpes simplex virus thymidine kinase, ADV-TK: Adenovirus Thymidine Kinase, Rat prodrug enzyme CYP2B1.

Tumor suppressor : p53, nitroreductase, NV1020, E1B deleted.

Cytokine : IL-2, IL-12, Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Interferon-beta (IFN-beta), Tumor necrosis factor (TNF).

Receptor : Fas-TNF Receptor Chimera Transgene, B7.1 (CD80).

Antigen : Oncofoetal antigen 5T4, Carcinoembryonic antigen (CEA), CAP-1 peptide from CEA, MUC-1, MAGE-1, MAGE-3, Human telomerase reverse transcriptase (hTERT), HLA-B7/Beta 2-Microglobulin, PRAME and PSMA, Alpha-Fetoprotein.

Antisense : Antisense DNA to human X-linked inhibitor of apoptosis, Transforming Growth Factor-2 (TGF-2) antisense.

Adhesion molecule : Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), LFA-3.

Marker : Humanized Escherichia coli –galactosidase, CD3.

Growth Factor : IGF-1.

Annexe 7. Article 1

Technical Report

Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: New means for drug metabolism and toxicity studies

Veronique Laurent^{1–5}, Aurore Fraix^{2–5}, Tristan Montier^{3–5}, Sandrine Cammas-Marion^{4–5}, Catherine Ribault¹, Thierry Benvegna^{4–5}, Paul-Alain Jaffres^{2–5} and Pascal Loyer^{1–5}

¹ INSERM U991, IFR140, Université de Rennes 1, Foie, Métabolisme et Cancer, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

² CEMCA, Equipe Phosphore et vectorisation, UMR 6521 CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

³ INSERM U613, Génétique Moléculaire et Epidémiologie Génétique, Hôpital Morvan, CHU de Brest, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, Brest, France

⁴ Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), UMR 6226 CNRS Sciences chimiques de Rennes, Equipe Chimie organique et supramoléculaire, Université Européenne de Bretagne, Rennes, France

⁵ Plateforme IBISA SynNanoVect, Biogenouest®, Brest-Rennes, France

HepaRG progenitor cells are capable of differentiating into hepatocyte-like cells that express a large set of liver-specific functions. These cells, however, only express small amounts of an important cytochrome P450, the CYP2E1, which limits their use for toxicological studies of drugs metabolized by this pathway. Our aim was to establish an efficient transfection protocol to increase CYP2E1 expression in HepaRG cells. Transfection protocols of the green fluorescent protein (GFP) reporter gene were evaluated using electroporation and cationic lipids belonging to the lipophosphonates, lipophosphoramidates and lipids derived from glycine betaine. Following optimization of the charge ratios, plasmid DNA and formulations with neutral co-lipids, the lipophosphoramidate compounds KLN47 and BSV10, allowed expression of the GFP in ~50% of adherent progenitor HepaRG cells, while electroporation targeted GFP expression in ~85% of both progenitor and differentiated cells in suspension. Transient enforced expression of active CYP2E1 was also achieved in progenitors and/or differentiated HepaRG cells using the electroporation and the lipophosphoramidate compound BSV10. Importantly, in electroporated cells, CYP2E1 expression level was correlated with a significant increase in CYP2E1-specific enzymatic activity, which opens new perspectives for this CYP-dependent drug metabolism and toxicity studies using HepaRG cells.

Received 14 October 2009

Revised 4 January 2010

Accepted 18 January 2010

Keywords: Cationic lipids · CYP2E1 · Electroporation · HepaRG cells · Transfection

Differentiated hepatocytes perform many complex metabolic processes including synthesis and secretion of plasma proteins, synthesis and storage of glycogen and detoxication of endogenous toxins and xenobiotics. To study the process of differenti-

ation and to characterize the enzymatic activities in the hepatocytes two main categories of *in vitro* models have been developed over the past 20 years: the primary cultures of normal hepatocytes and the hepatoma cell lines. Human hepatocytes can be plated in culture conditions maintaining cell survival and expression of liver-specific functions for several days to weeks [1]. Although these models have proven to be relevant for studying some aspects of the liver biology, such as induction of drug metabolism enzymes (DMEs) by xenobiotics, large variations in functional activities especially for cy-

Correspondence: Dr. Pascal Loyer, INSERM U991, Hôpital Pontchaillou, Avenue de la Bataille Flandres-Dunkerque, 35033 Rennes, France
E-mail: pascal.loyer@univ-rennes1.fr

Abbreviations: CYP, cytochrome P450 enzymes; DME, drug metabolism enzyme; GFP, green fluorescent protein

tochrome P450 enzymes (CYP) have been observed in human hepatocytes isolated from different donors [1]. In addition, the relative shortage and unpredictable availability of human biopsies along with the limited growth activity and lifespan of hepatocytes in primary culture limit the use of these models.

Alternatively, hepatoma cell lines have been established from differentiated hepatocellular carcinomas that retain various expression levels of liver-specific proteins. These cells contain low CYP activities [2], which limits their use for studying liver metabolism and toxicity of xenobiotics. Enforced expression of CYPs has been obtained in hepatoma cells by transient or stable transfection of expression vectors encoding the CYPs themselves or liver-specific transcription factor such as C/EBP alpha [3]. These transfected cells are relevant models for studying metabolism of new drugs by specific CYPs. However, they do not express the full panel of DMEs required for complete phase I, II and III metabolism of xenobiotics.

The human hepatoma cell line HepaRG derived from a hepatocellular carcinoma [4] circumvents these drawbacks by expressing most of the liver-specific functions, including high levels of the major CYPs such as CYP3A4 and CYP1A2 [5, 6]. Progenitors HepaRG cells that differentiate into hepatocyte-like cells also represent a unique *in vitro* cell system to investigate the process of differentiation from hepatic progenitor cells towards hepatocyte-like cells [7] as well as the phenomenon of transdifferentiation from hepatocyte to biliary phenotypes or *vice versa* [7]. In addition, this hepatoma cell line provides a valuable *in vitro* model for investigating replication of the hepatitis B virus [4], drug metabolism [5, 6, 8] and genotoxic compounds [9]. However, the relatively low level of the CYP2E1 enzyme in HepaRG cells [5, 6] limits their use for analyzing biotransformation of xenobiotics specifically metabolized by this DME. CYP2E1 plays a major role in the metabolism of many xenobiotics in all humans [10]. Thus, expression of higher levels of CYP2E1, achieved by transfection in differentiated HepaRG cells, would be particularly useful to complete the pathways of biotransformation in these cells.

It is generally accepted that hepatic cells, especially primary hepatocytes, are difficult to transfect [11]. Liposome-mediated transient transfection using the most recent cationic lipids allowed gene delivery in 10–30% of rodent and human hepatocytes in primary culture. These protocols were useful for studying regulatory gene sequences [11] but remained of limited help for investigating the effect(s) of enforced expression of gene of interest in

whole cell populations because of the relatively low rate of transfection.

Because of the raising interest in HepaRG cells for drug metabolism studies and for analyzing the process of differentiation from hepatic progenitors towards hepatocytes, optimization of HepaRG cell transfection has become a pertinent task. The aim of this work was first to establish efficient protocols of transfection of both progenitor and differentiated HepaRG cells, and to achieve enforced expression of CYP2E1 protein.

The HepaRG cells are available from Dr. Guillozo (christiane.guillozo@univ-rennes1.fr) for academic laboratories and from Dr. Chesné (christophe.chesne@biopredic.com) for industrial laboratories. Progenitor HepaRG cells were cultured as previously described [4, 5, 7]. For full expression of liver-specific genes in hepatocyte-like cells, the culture medium was supplemented with 2% DMSO for 2 more weeks following confluency [5].

A panel of commercial transfection reagents (Supplemental data S1) and the pEGFP-C3 (Clontech, Saint Germain en Laye, France) expression vector encoding the green fluorescent protein (GFP) were used to transfect HepaRG cells. GFP-positive cells were detected 48 h after transfection using the FC500 cytometer (Beckman Coulter, France). The mean of fluorescence (Geo mean) was determined for the GFP-positive cell population. To determine background fluorescence, HepaRG cells were transfected with the non-coding pC3 plasmid (pEGFP-C3 lacking the GFP cDNA). Cell viability was assessed using the side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC) dot plot. Previous experiments showed a clear decrease in size (FSC) and increase in structure (SSC) in HepaRG cells undergoing necrosis or apoptosis compared to viable cells. GFP-positive cells were visualized with a Zeiss fluorescent microscope and the AxioVision LE Rel. 4.3 software.

In progenitor HepaRG cells, Lipofectamine 2000® was the most potent transfection reagent with an efficiency reaching 25% of GFP-positive cells but with a strong toxicity. Other reagents allowed GFP expression in only 10–15% of cells. In differentiated hepatocyte-like cells, transfection rates were even lower (1–14%) than in progenitor cells (Supplemental data S1).

We next evaluated the lipophosphonates GLB43 and EG316 and lipophosphoramidates KLN25, KLN47 and BSV10 (Fig. 1) [12, 13]. We also evaluated the MM18 compound belonging to a family of glycine betaine lipids, which is efficient for transfection in mouse hepatocytes [14]. The lipophosphonates GLB43 and EG316, and the lipophospho-

ramidates KLN47 and BSV10 have been reported previously [12]. For the KLN25 and the glycine betaine MM18 [13], the syntheses are detailed in Supplemental data S2 and S3. All lipids are presented in Supplemental data S4, and the preparation of liposomes is described in Supplemental data S5. Transfections with the lipophosphonates, lipophosphoramidates and the MM18 produced by the IBSA platform “SynNanoVect” from Biogenouest® (France) were performed using 10^5 cells/well (in 24-multiwell plates) plated 24 h prior transfection. Liposome suspensions (10 mg lipids/mL) were sonicated using an ultrasound water bath sonicator for 5 min. Liposomes and plasmids (0.5 μ g) were diluted in 100 μ L OptiMEM medium (Gibco) prior mixing DNA plasmid dilution with liposome suspension. The resulting lipoplex solutions were vortexed for 30 s, incubated at room temperature for 30 min, added dropwise to the culture medium of HepaRG cells deprived of antibiotics and incubated for 4 h with cells prior to culture medium renewal.

A broad range of charge ratios from 0.5 to 16 was tested with 0.8 μ g DNA plasmid (Fig. 1). Different liposomal compositions were also studied including either the cationic lipid alone or associated with the neutral co-lipids DOPE or cholesterol, known to promote fusion between the lipoplexes and cellular membranes and to increase lipoplex stability, respectively. The KLN47 was used alone since we previously showed that its association with DOPE and cholesterol strongly reduced plasmid DNA delivery.

For the EG316, GLB43 and KLN25 liposomes (Figs. 1A–C), the highest transfection efficiencies in progenitor HepaRG cells were 16 ± 3 , 14 ± 1 and $7 \pm 1\%$, respectively, at the optimal charge ratio of 2. The cell viability decreased with high charge ratio. With BSV10 lipid (Fig. 1D), the percentage of GFP-positive cells increased proportionally to the charge ratio up to ~20% at the ratios 8 and 16, but was associated with low cell viabilities. MM18 lipid was a less efficient compound (~5% of GFP cells) with reduced cell viability at high charge ratios (Fig. 1E). The KLN47 compound allowed the highest gene transfer into HepaRG cells with efficiencies up to 45% for the charge ratio of 4 with cell viability down to ~60% of control culture (Fig. 1F).

Combining lipids EG316, GLB43, KLN25, BSV10 to the co-lipid DOPE significantly improved transfection efficiencies of HepaRG cells (i.e., ~40% of GFP-positive cells with BSV10-DOPE, ~80% cell viability at the charge ratio of 1). The MM18 liposome formulation with 15% cholesterol also significantly increased the transfection rate up to 20% of GFP-positive cells at the charge ratio of 2 (Fig. 1E). The

benefit of using the co-lipid DOPE is probably due to its ability to induce an intracellular transition of the liposome/DNA complex from a lamellar to a non-lamellar phase, which enhances DNA release. Similar experiments were also performed with differentiated HepaRG cells but none of these formulations gave transfection efficiencies higher than 10% (data not shown) and, thus, did not improve transfection rates obtained with commercially available reagents. In conclusion, the KLN47 and BSV10/DOPE formulations allowed high gene delivery in proliferating progenitor cells (~50%) but not in quiescent differentiated HepaRG cells, in agreement with the fact that gene transfer by liposomes depends upon cell cycle [15].

We then evaluated the Microporator MP100 from LabTech France (Paris) designed to deliver DNA into cells in suspension [note: the device originally engineered by Digital Bio (NanoEnTek Inc., Korea) is now commercialized as the Neon™ electroporator from Invitrogen (Carlsbad, USA)]. Progenitor HepaRG cells were detached by trypsinization, whereas differentiated HepaRG cells were selectively detached by mild trypsinization at room temperature [7]. Cells were washed twice with PBS and resuspended in buffer R (10^7 cells/mL). For both progenitor and hepatocyte-like HepaRG cells, 24 conditions of electroporation were tested (Supplemental data S6).

In progenitor cells, 16 conditions gave transfection rates between 80 and 95% of GFP-positive cells with cell viabilities ranging from 65 to 90% (Fig. 2A). Other settings led to lower transfection efficiencies, which, however, remained above 50% of GFP-positive cells with high cell viability rates. In hepatocyte-like cells, electroporation also allowed efficient DNA delivery and high expression levels of the GFP proteins; two conditions (C5 and 4) reached transfection and cell viability rates above 80% (Fig. 2B). The other settings led to transfection efficiencies ranging from 25 to 78% with cell viabilities varying considerably.

These data demonstrated that in HepaRG cells, electroporation is a more efficient technology for gene delivery than the cationic lipids tested. However, the transfection using the lipophosphoramidate compounds KLN47 and BSV10 will be useful since gene delivery is performed with adherent progenitor cells in contrast with the electroporation of cell suspensions. The high rate of transfection in differentiated HepaRG cells by electroporation confirms the notion that electroporation facilitates the nuclear translocation of plasmid DNA in poorly proliferating cells [16].

We next addressed the question of the relationship between the efficiency of transfection and the

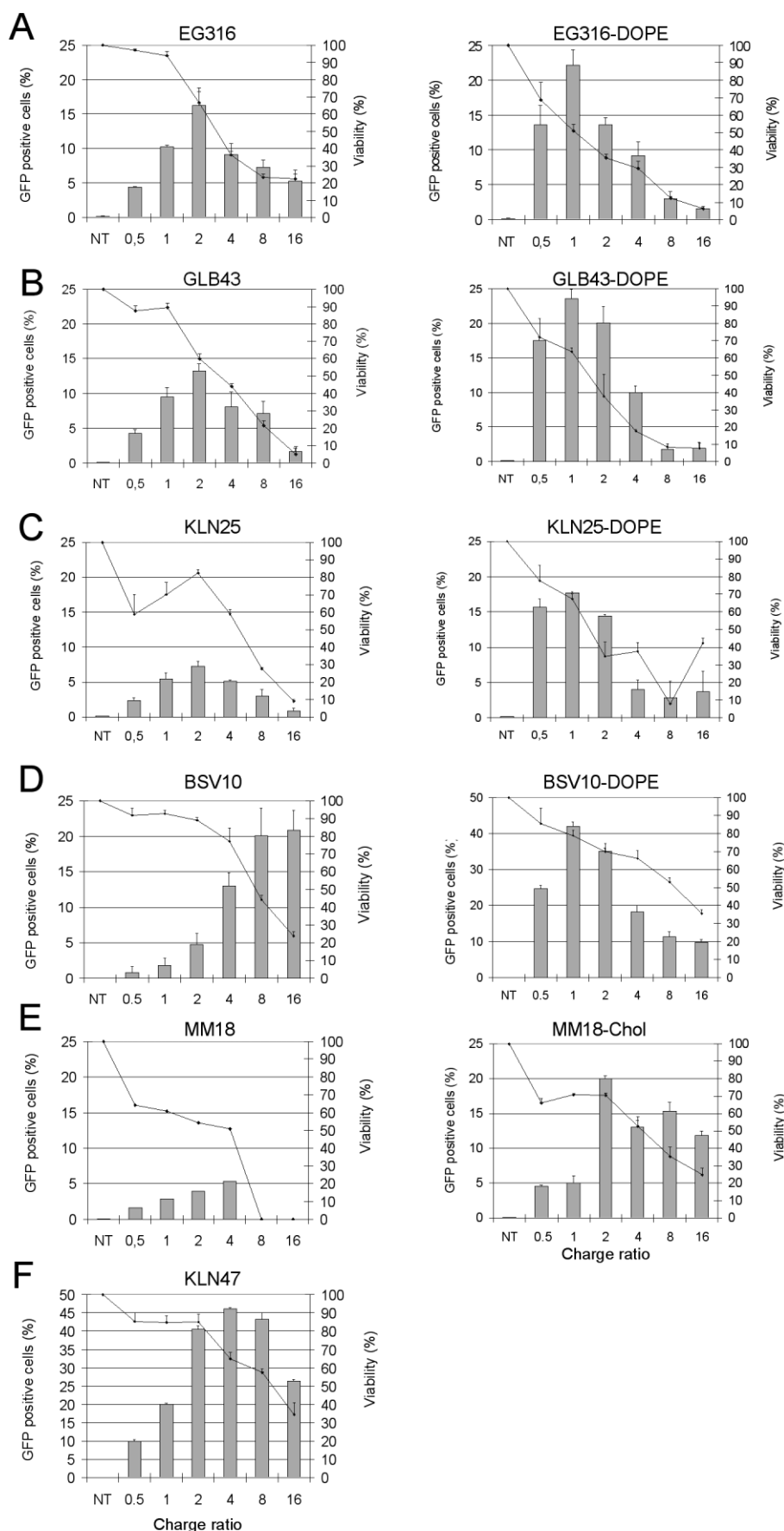


Figure 1. Transfection of HepaRG cells with the cationic lipophosphonates, lipophosphoramidates and glycine betaine lipids. The lipophosphonates EG316 (A) and GLB43 (B) and lipophosphoramidate KLN25 (C), BSV10 (D) and KLN47 (F) and the glycine betaine lipid MM18 (E) were used to transfect progenitor HepaRG cells. Adherent cells (10^5 cells) were transfected with $0.8 \mu\text{g}$ pEGFPC3 vector and cationic lipids either used alone (left side) or combined with the neutral co-lipid DOPE or cholesterol (Chol) (right side) at different charge ratios (0.5–16; abscissa axis). GFP expression (histograms) and cell viability (lines) were detected by flow cytometry 48 h after transfection. Background fluorescence was determined for all liposome formulations using the non-coding pc3 DNA plasmid. Results of three independent experiments are expressed as percentages of GFP-positive cells and cell viability compared to non-transfected control cells (NT).

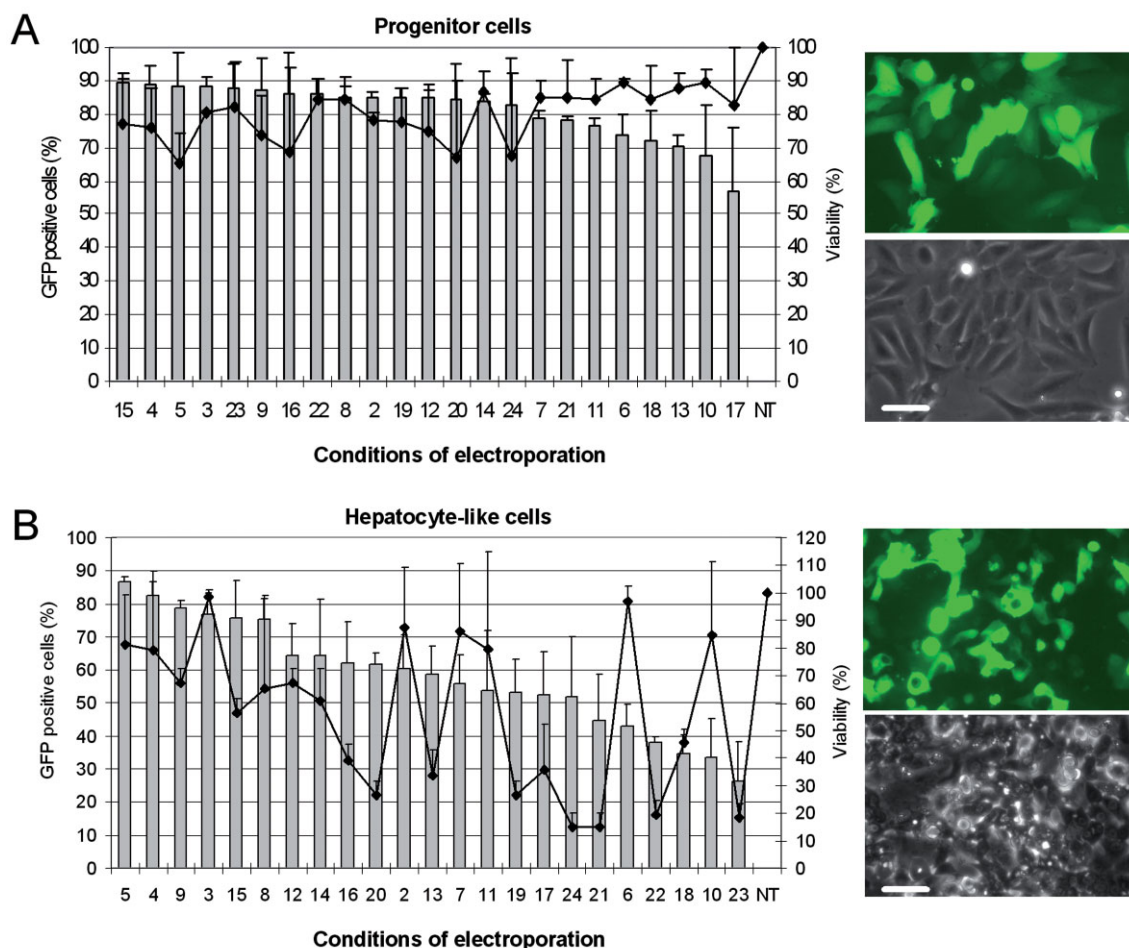


Figure 2. Transfection of progenitor and differentiated HepaRG cells by electroporation. The Microporator MP100 (Neon™ system from Invitrogen), designed to deliver DNA into cells in suspension, was used to transfect 0.5 μ g pEGFPc3 expression vector encoding the GFP reporter gene in 10^5 progenitor (A) and differentiated (B) HepaRG cells. GFP expression (histograms) and cell viability (lines) were detected by flow cytometry. Results of three independent experiments are expressed as percentages of GFP-positive cells and cell viability compared to non-transfected control cells (NT). Progenitor and differentiated HepaRG cells expressing GFP were visualized by fluorescence microscopy and phase contrast (photographs on right, white bar: 20 μ m).

amount of plasmid DNA. The percentage of GFP-positive cells and the mean of fluorescence were measured according to the amounts of DNA ranging (from 10 ng to 2 μ g/ 10^5 cells) using electroporation and the liposomes BSV10/DOPE, GLB43/DOPE and MM18/Chol (Supplemental data S7).

For electroporation, the smallest amount of DNA (10 ng) led to ~20% of GFP-positive cells. This percentage was linear up to 0.2 μ g plasmid to reach ~70% of GFP-expressing cells. For 0.3–0.6 μ g plasmid, the maximal efficiency was reached (~85%), while high amounts up to 2 μ g plasmid slightly decreased the rate of transfection. The mean of fluorescence did not correlate with the percentage of GFP-positive cells for the small amounts of DNA but increased abruptly to reach the highest fluorescence intensity for the amounts between 0.3 and 0.6 μ g plasmid.

For BSV10/DOPE, GLB43/DOPE and MM18/Chol liposomes, optimal transfection efficiencies were obtained for 0.4, 1 and 0.8 μ g plasmid, respectively, and the mean fluorescence correlated well with the percentage of GFP-positive cells. GFP expression remained very low (<5%) up to 0.1 μ g plasmid and was not proportional to the amount of DNA, whereas between 0.1 and 0.4 (\pm 0.2) μ g DNA, this percentage was linear.

We then studied whether the percentages of GFP-positive cells were correlated to the intracellular amount of plasmid. Percentages of GFP progenitor HepaRG cells, transfected with the pEGFPc3, were compared to the ratio of fluorescence between cells transfected with the non-coding rhodamine-labeled and unlabeled pC3 plasmids (Supplemental data S8). Transfection by electroporation or with the BSV10/DOPE liposomes that

yielded 80% and 50% GFP-positive cells were characterized by small fluorescence ratios of 3.5 and 4.5, respectively. In contrast, the GLB43/DOPE and MM18/Chol liposomes, which triggered only 15 and 5% of GFP expression, exhibited high fluorescence ratios of 8 and 12. *In situ* visualization of FITC-labeled pC3 plasmid confirmed that cells transfected with MM18/Chol liposomes exhibited larger and more intense fluorescent dots than electroporated cells. These data further confirm that the improvement of nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA following non-viral gene transfer is a key parameter for achieving high gene expression [17].

Following the optimization of the transfection in HepaRG cells, we next assayed the transient ectopic expression of the CYP2E1 (Fig. 3). The human CYP2E1 cDNA (obtained from Dr. De Waziers, INSERM U775, Université Paris Descartes, France) was amplified by PCR using the primers ATGTCTGCCCTCGGAGTCACC (forward) and TCATGAGCGGGGAATGACACA (reverse) and inserted into the pcDNA3.1/V5-His-Topo. Both progenitor and differentiated hepatocyte-like HepaRG cells were transfected with the pEGFPc3 or the human CYP2E1 encoding vector using electroporation

(Fig. 3A) and the lipids BSV10 and KLN47 (Fig. 3C). For immunoblotting of the GFP (antibody: T-19, sc5384, Santa Cruz Biotechnology), the CYP3A4 (antibody: AB1254, Chemicon), the CYP2E1 (antibody: Oxford Biomedical, USA) and the HSC70 (antibody: B-6, sc7298, Santa Cruz Biotechnology), cells were lysed in 50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween 20 supplemented with protease inhibitors (EDTA-free, Roche). Of the total proteins, 10 µg was resolved on 12.5% SDS-PAGE (NewPage, Invitrogen), transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted.

As expected, CYP2E1 and CYP3A4 were undetectable in progenitor cells while hepatocyte-like cells expressed high levels of CYP3A4 and low amounts of CYP2E1 (Fig. 3A). In contrast, progenitors and differentiated HepaRG cells electroporated with the CYP2E1 vector expressed much higher levels of this DME, whereas the CYP3A4 level in hepatocyte-like cells was not affected by electroporation (Fig. 3A). Interestingly, the highest levels of GFP and CYP2E1 were observed in hepatocyte-like HepaRG cells, although the percentages of GFP-positive cells are very similar in both progen-

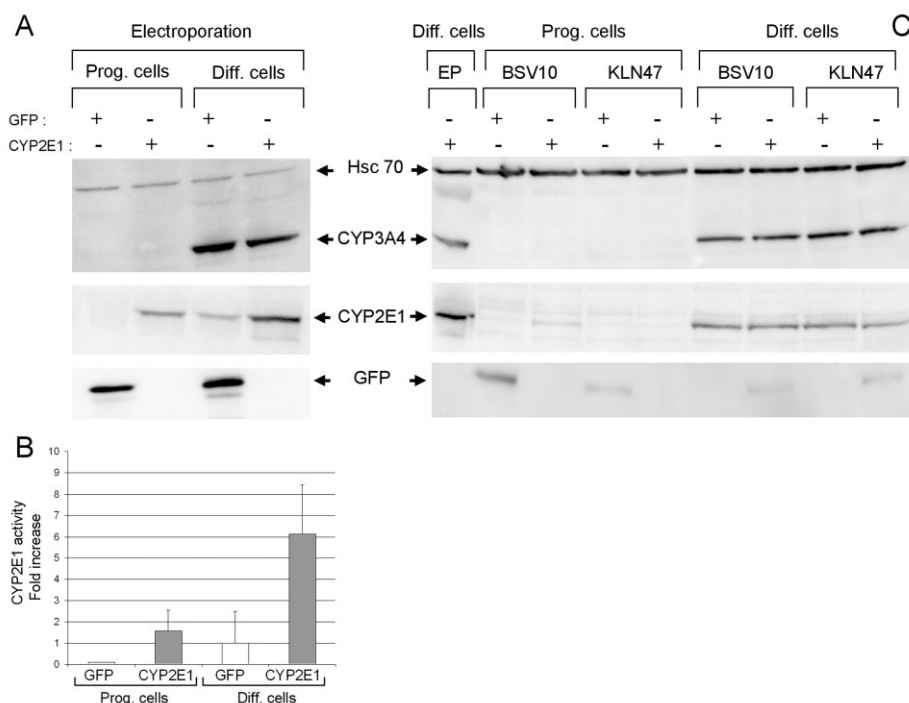


Figure 3. Transient enforced expression of the CYP2E1 in differentiated HepaRG cells. Progenitor (Prog. cells) and differentiated HepaRG (Diff. cells) cells were electroporated (A) or transfected with the BSV10/DOPE and KLN47 liposomes (C) and the GFP or CYP2E1 expression vector (+ indicates the vector used). The expression levels of the CYP3A4, CYP2E1 and the GFP were analyzed by immunoblotting, and Hsc70 was used as loading control. (C) First lane: differentiated HepaRG electroporated (EP) with the CYP2E1 vector. (B) In electroporated cells, the CYP2E1-specific enzymatic activities were measured using the chlorzoxazone as substrate followed by detection of the 6-hydroxychlorzoxazone metabolite by HPLC. Results of three independent experiments are expressed as the fold increase in CYP2E1-specific enzymatic activity compared to the basal activity (arbitrarily set as 1) in differentiated HepaRG cells transfected with the GFP vector.

itor and differentiated cells (Fig. 2). This is most likely due to the high overall protein synthesis in differentiated *versus* progenitor cells. Importantly, the CYP2E1 expression level in transfected cells was correlated with a ~5–6-fold increase in the CYP2E1-specific enzymatic activity compared to the activity in the control cells (Fig. 3B).

We also showed the expression of the GFP and CYP2E1 proteins in the progenitor cells transfected with the BSV10/DOPE formulation and, to a much lesser extent, with the lipid KLN47 (Fig. 3C). However, in differentiated cells, we did not observe any significant increase in CYP2E1 expression following transfection with these lipids, while the GFP was detected at low levels (Fig. 3C).

Together, these data demonstrated that using the electroporation, we achieved the enforced expression of the human CYP2E1 in differentiated HepaRG cells. This DME is of an enormous toxicological and carcinogenic importance because of its implication in the metabolism of a large number of chemicals such as ethanol, acetaminophen, acrylamide and many suspected cancer agents [10]. Thus, low expression of CYP2E1 in differentiated HepaRG cells was a clear limitation in their use for metabolism and toxicological studies of a wide range of molecules with relevance for human health. Differentiated HepaRG cells expressing high levels of the most important CYPs, including the CYP2E1, definitely opens new perspectives for drug metabolism and toxicity studies of a variety of new drugs.

We thank D. Glaise for technical assistance with HepaRG cell culture, Dr. C. Chesné and G. Ribault (Biopredic Int.) for measurement of the CYP2E1 activity, Dr. L. Lemiègre for helping with the synthesis of the MM18 glycine betaine lipid and Dr F. Desmots for helping with the design of the figures. Flow cytometry was performed with the core facility of the Institut Fédératif de Recherche de Rennes (IFR140). V.L. was a recipient of fellowships from l'association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaëtan Saleün (EFS, Brest) and la Ligue Contre le Cancer. A.F. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. This work was funded by INSERM, Institut Fédératif de Recherche de Rennes (IFR140), Région Bretagne (PRIR Vect-Synth), the GIS-IBiSA and the European Commission FP7 program "LIV-ES" (HEALTH-F5-2008-223317).

The authors have declared no conflict of interest.

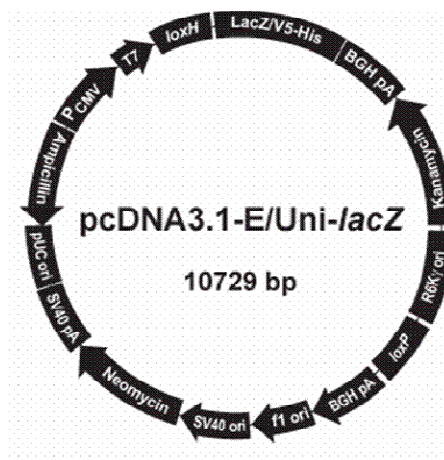
References

- [1] Guillouzo, A., Guguen-Guillouzo, C., Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2008, 4, 1279–1294.
- [2] Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A., Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 2003, 31, 1035–1042.
- [3] Jover, R., Bort, R., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V., Re-expression of C/EBP α induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 1998, 431, 227–230.
- [4] Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J. *et al.*, Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 15655–15660.
- [5] Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T. *et al.*, Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 2006, 34, 75–83.
- [6] Kanebratt, K. P., Andersson, T. B., Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* 2008, 36, 1444–1452.
- [7] Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S. *et al.*, Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007, 45, 957–967.
- [8] Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D. *et al.*, The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 2007, 168, 66–73.
- [9] Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J. *et al.*, Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.*, 2008, 36, 1111–1118.
- [10] Gonzales, F. J., The 2006 Bernard B. Brodie Award lecture: CYP2E1. *Drug Metab. Dispos.* 2007, 35, 1–8.
- [11] Ourlin, J. C., Vilarem, M. J., Daujat, M., Harricane, M. C. *et al.*, Lipid-mediated transfection of normal adult human hepatocytes in primary culture. *Anal. Biochem.* 1997, 247, 34–44.
- [12] Mével, M., Breuzard, G., Yaouanc, J.-J., Clément, J.-C. *et al.*, Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: High efficiency of an imidazolium derivative. *ChemBioChem* 2008, 9, 1462–1471.
- [13] Montier, T., Benvegna, T., Jaffrès, P.-A., Yaouanc, J.-J. *et al.*, Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: A series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* 2008, 8, 296–312.
- [14] Gilot, D., Miramon, M. L., Benvegna, T., Ferrieres, V. *et al.*, Cationic lipids derived from glycine betaine promote efficient and non-toxic gene transfection in cultured hepatocytes. *J. Gene Med.* 2002, 4, 415–427.
- [15] Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M., Wagner, E., Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.* 2000, 7, 401–407.
- [16] Brunner, S., Fürstbauer, E., Sauer, T., Kurs, M. *et al.*, Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol. Ther.* 2002, 5, 80–86.
- [17] Lechardeur, D., Lukacs, G. L., Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: A perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum. Gene Ther.* 2006, 17, 882–889.

Annexe 8.

Cartes des plasmides

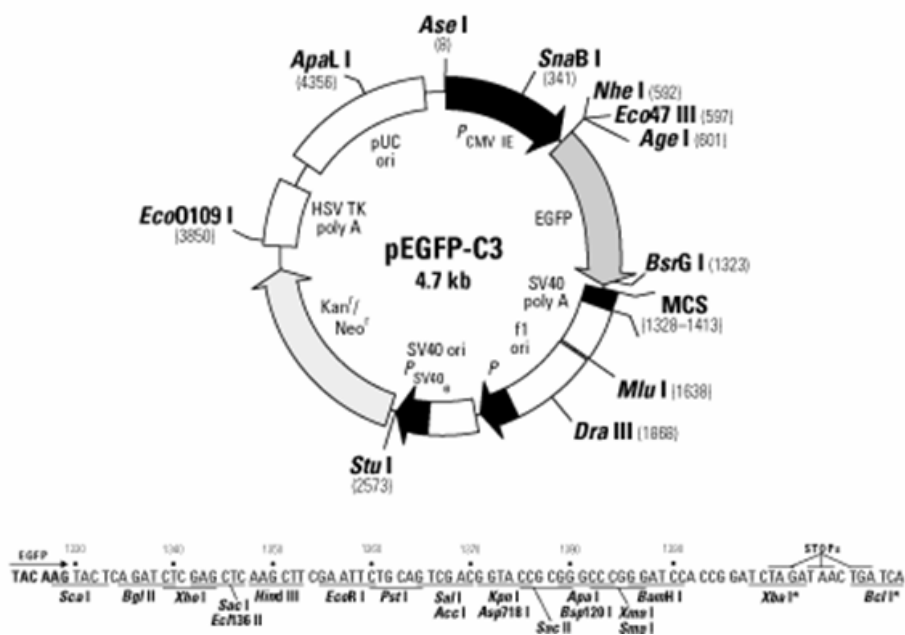
Cartes des plasmides pcDNA3.1-LacZ et pEGFP



Carte du plasmide pcDNA3.1-LacZ [Invitrogen]

pEGFP-C3 Vector Information
GenBank Accession #: U57607

PT3052-5
Catalog #6082-1



Carte du plasmide pEGFP-C3 [Clontech]

Annexe 9. Article 2

Preferential induction of the AhR gene battery in HepaRG cells after a single or repeated exposure to heterocyclic aromatic amines

Julie Dumont^{a,b,1}, Rozenn Jossé^{a,b}, Carine Lambert^{a,b}, Sébastien Anthérieu^{a,b}, Véronique Laurent^{a,b}, Pascal Loyer^{a,b}, Marie-Anne Robin^{a,b}, André Guillouzo^{a,b}.

^a Inserm UMR 991, F-35043 Rennes cedex, France ;

^b Université de Rennes 1, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, F-35043 Rennes cedex, France ;

¹ Present address: Inserm UMR 744 - Université Lille Nord de France - Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1, rue du professeur Calmette, F-59019 Lille cedex, France.

e-mail addresses:

Julie.Dumont@pasteur-lille.fr

Rozenn.Josse@univ-rennes1.fr

Carine.Lambert45@gmail.com

Sebastien.Antherieu@univ-rennes1.fr

Veronique.Laurent@univ-rennes1.fr

Pascal.Loyer@univ-rennes1.fr

Marie-Anne.Robin@inserm.fr

Andre.Guillouzo@univ-rennes1.fr

Corresponding author:

Pr. André Guillouzo

Inserm UMR 991, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, F-35043 Rennes Cedex, France. Phone: +33 223234791, Fax: +33 223235385, Email: Andre.Guillouzo@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) are two of the most common heterocyclic aromatic amines (HAA) produced during cooking of meat, fish and poultry. Both HAA produce different tumor profiles in rodents and are suspected to be carcinogenic in humans. In order to better understand the molecular basis of HAA toxicity, we have analyzed gene expression profiles in the metabolically competent human HepaRG cells using pangenomic oligonucleotide microarrays, after either a single (24-h) or a repeated (28-day) exposure to 10 μ M PhIP or MeIQx. The most responsive genes to both HAA were downstream targets of the arylhydrocarbon receptor (AhR): *CYP1A1* and *CYP1A2* after both time points and *CYP1B1* and *ALDH3A1* after 28 days. Accordingly, *CYP1A1/1A2* induction in HAA-treated HepaRG cells was prevented by chemical inhibition or small interference RNA-mediated down-regulation of the AhR. Consistently, HAA induced activity of the *CYP1A1* promoter, which contains a consensus AhR-related xenobiotic-responsive element (XRE). In addition, several other genes exhibited both time-dependent and compound-specific expression changes with, however, a smaller magnitude than previously reported for the prototypical AhR target genes. These changes concerned genes mainly related to cell growth and proliferation, apoptosis, and cancer. In conclusion, these results identify the AhR gene battery as the preferential target of PhIP and MeIQx in HepaRG cells and further support the hypothesis that intake of HAA in diet might increase human cancer risk.

Keywords: Heterocyclic aromatic amines, toxicogenomics, arylhydrocarbon receptor, HepaRG cells, repeated exposure.

Abbreviations: 3-MC, 3-methylcholanthrene; AhR, Arylhydrocarbon receptor; ANF, α -naphthoflavone; CYP, Cytochrome P450; DMSO, Dimethylsulfoxide; FC, Fold change; FCS, Fetal calf serum; HAA, Heterocyclic aromatic amines; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; MeIQx, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline; NR, Neutral red; Nrf2, NF-E2-related factor 2; PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; S.E.M., Standard error of the mean; XRE, xenobiotic-responsive element.

INTRODUCTION

Risk assessment for human health of long-term exposure to environmental and food contaminants is currently a major challenge. While a number of pollutants induce cancers in experimental animals after chronic exposure, they are only suspected to be carcinogenic in humans based on the weight of evidence from epidemiological studies. Accordingly, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), which are among the most abundant heterocyclic aromatic amines (HAA) formed in fried or grilled fish and meat (Felton *et al.*, 1986), are genotoxic and carcinogenic at multiple tissue sites and in multiple species after long-term feeding (Sugimura *et al.*, 2004). However, although chemically similar, these two HAA produce, in general, different tumor profiles in rodents and only MeIQx induces liver tumors (Sugimura *et al.*, 2004). Some epidemiological studies have also suggested positive associations between the intake of well-done or grilled meat and human cancer risk (Alaejos *et al.*, 2008) but they are insufficient to support that increased cancer risk is due specifically to PhIP and/or MeIQx and/or another HAA.

PhIP and MeIQx are mainly metabolized in the liver of both rodents and humans in a N-hydroxy-derivative, which is mutagenic (Turesky *et al.*, 2002). However, interspecies differences have been shown in both catalytic activity and regioselectivity of cytochromes P450 (CYP) and other liver enzymes involved in their metabolism (Langouet *et al.*, 2002), potentially affecting their biological activities and making questionable the use of animal models for estimating risks of HAA for human health.

Toxicogenomics technologies have emerged as promising approaches for a better identification and discrimination of cellular responses to chemicals. Recent studies have suggested that gene expression profiles following short-term *in vivo* or *in vitro* treatments could permit predicting carcinogenic and other toxic properties of environmental chemicals (Fielden *et al.*, 2008; Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009; Tsujimura *et al.*, 2006; van Delft *et al.*, 2005). In the present study, we used metabolically competent human hepatoma HepaRG cells that remain functionally stable during several weeks at confluence (Josse *et al.*, 2008) to analyze changes in gene expression in response to PhIP and MeIQx after a single or repeated exposure during 4 weeks. Although both time-dependent and compound-specific alterations of gene expression were identified after exposure to PhIP and MeIQx, target genes of the arylhydrocarbon receptor (AhR) were the most induced in all experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-methylcholanthrene (3-MC), α -naphthoflavone (ANF) and neutral red (NR) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Williams'E medium was supplied by Eurobio (Les Ulis, France) and fetal calf serum (FCS) by Perbio (Brebieres,

France). PhIP and MeIQx, were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). All other chemicals were of the highest quality available.

Cell culture and HAA treatments

HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm² in the Williams'E medium supplemented with 10% FCS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM glutamine and 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate (Gripon *et al.*, 2002). After two weeks they were shifted to the same culture medium supplemented with 2% DMSO for two more weeks. At that time HepaRG cells were well differentiated and used for HAA testing. PhIP and MeIQx were dissolved in DMSO; both control and treated cultures received the same final concentration of vehicle. Whatever the time of exposure, HAA-treatment was performed in a culture medium containing both 10% FCS and 2% DMSO, which maintains maximum metabolic capacity of HepaRG cells without any cytotoxicity (Aninat *et al.*, 2006; Josse *et al.*, 2008). For 28 days exposure, HAA were added every two days with each medium renewal. All samples for analysis of HAA-induced effects at 24h and 28 days were collected simultaneously.

Cytotoxicity measurements

ATP assay

After treatment, cultures were observed under phase-contrast microscopy using an Olympus 1x70 microscope and intracellular ATP content was measured using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega, Charbonnières, France) according to manufacturer's instructions.

Neutral Red (NR) incorporation assay

At the end of treatments, cells were stained with 0.4 % NR solution for 3 h, then rapidly fixed with a 4% formaldehyde/1% calcium chloride solution and destained with 50% ethanol/1% acetic acid. Dye uptake was determined as optical density (540 nm).

RNA isolation

Total RNA was extracted with the SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI), which includes a direct DNase treatment step. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France) and RNA integrity was checked with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France).

Retrotranscription and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

Five hundred nanograms of total RNA were reversed-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). RT-qPCR was performed by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix and the ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Primers pairs for each transcript are described in Supplemental table S1. Amplification curves were read with the ABI Prism 7000 SDS Software using the comparative cycle threshold method and the relative quantification of the steady-state mRNA levels was normalized against 18S RNA.

Microarray analysis

Experimental conditions were previously described (Lambert *et al.*, 2009). Briefly, 500 ng of total RNA from each cell culture were reverse-transcribed into double-strand cDNAs using the Low RNA Input Linear Amplification Labeling Kit (Agilent). cDNAs were transcribed into antisense cRNA and labeled with either CTP-Cy3 or CTP-Cy5 fluorescent dyes following the manufacturer's protocol. Cyanine-labeled cRNAs were purified using RNeasy minikit (Qiagen). Then, control Cy3-RNAs and HAA-treated Cy5-RNAs were pooled together and hybridized using the Hybridisation Kit Plus (Agilent) onto 4x44K Whole Human Genome Microarrays (G4112F, Agilent), satisfying Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) requirements. Two independent hybridizations with Fluor reversal corresponding to two technical replicates were performed for each experimental condition. After incubation and washing, microarrays were scanned with the Agilent microarray G2566AA scanner. Data were extracted and normalized from the resulting images using Agilent Feature Extraction software (v.9.5). Data analyses were performed using GeneSpring GX v.10.0 software for database management, quality control and analysis. Microarray quality was assessed by examining the values in the principal component analysis and the quality control metrics. Hierarchical clustering using Pearson's correlation and the Ward's min variance link heuristic criteria was performed on all arrays to determine if replicates behave similarly in order to exclude outliers. Significantly modulated genes were analyzed from combined replicates with $p \leq 0.01$ and 1.5-fold change (FC) as filters ($FC > 1.5$). Biological functions and pathways were generated and analyzed using Ingenuity Pathway Analysis v.4.0™ (IPA, Ingenuity System, CA) from combined data.

Transfection and luciferase assay

The pCYP1A1-FL(-1566) construct containing a 1639-base-pair region (from -1566 to +73) of the human CYP1A1 gene upstream of the firefly luciferase reporter gene (a gift from Pr. R. Barouki, Paris, France) and the pGL3-XRE3 construct, containing only three XRE sequences from CYP1A1 gene, have been described previously (Le Ferrec *et al.*, 2002). HepaRG cells were transiently electroporated as previously described (Laurent *et al.*, 2010) using a MP-100 Microporator (LabTech France, now available as the Neon system from Invitrogen). Briefly, 10^5 HepaRG cells were resuspended in 10 μ l of Microporation Buffer with 500 ng of pCYP1A1-FL(-1566) or pGL3-XRE3 constructs and 50 ng of pRL-SV40 vectors. HepaRG cells were electroporated at 1500 V for 20 ms and then plated at a density of 2×10^5 cells/cm². After a 24h period, cells were exposed to HAA for 24h. Firefly (pGL3-vector) and Renilla (pRL-vector) luciferase activities were measured using the Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega). Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity and data were expressed in arbitrary unit (a.u.), relative to the value of luciferase activity levels measured in untreated cells, arbitrarily set at 1.

siRNA knockdown of the AhR

A SMART-pool siRNA directed against the human AhR (si-AhR, Cat # L-004990) was purchased from Dharmacon RNA technologies (Boulder, CO). One million HepaRG cells was

transiently electroporated with either 100 pmoles of si-AhR or 100 pmoles of negative control siRNA (Dharmacon, Cat # D-001210-01) as described above. Two days after si-RNA transfection, HepaRG cells were treated with or without HAA and 24h later, total HepaRG cell RNA was extracted and subjected to reverse transcription as described above. The knockdown of AhR in the Si-RNA transfected cells was validated by western blotting.

Preparation of total cell lysates

Total cellular protein extracts were obtained by lysis of HepaRG cells in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5mM EGTA, 0.1% Tween-20, 10% glycerol, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 10 mM beta-glycerophosphate, and 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, supplemented with an EDTA-free cocktail protease inhibitor (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Western blotting

Fifty µg of total cellular protein extracts were resolved on 7.5% SDS–PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, Guyancourt, France) and analysed using chemiluminescence detection. The following antibodies were used: rabbit anti-human aryl hydrocarbon receptor (AhR) (SA-210, Biomol Research Labs, Plymouth, PA) and mouse anti-human Heat Shock Cognate 70 (HSC70) (B-6, sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Comparisons between groups were performed using the Kruskal-Wallis test. In case of significant difference between groups, the Mann-Whitney U test was used to test whether any condition was significantly different from control. $p < 0.05$ was interpreted as significant.

RESULTS

Toxicity of PhIP and MelQx as a function of time of exposure

Differentiated HepaRG cells were exposed to PhIP or MelQx at concentrations ranging from 0.1 to 10 µM for either 24h or 28 days. Regardless of the time of exposure, neither morphological alterations nor significant changes in cell viability using the ATP content assay were observed (Supplemental Figure 1). Similarly, the NR assay showed no obvious cytotoxicity (data not shown). Moreover, since HepaRG cell cultures were composed of both hepatocyte- and biliary-like cells (in a 50/50 ratio) (Cerec *et al.*, 2007), we verified that hepatocyte functions were not preferentially affected during prolonged exposure to HAA at the highest concentration tested (10 µM). No significant changes in either CYP3A4 activity or hepatocyte-specific transcripts encoding aldolase B and albumin were found over a 28-day period following treatment with either HAA (Supplemental Figure 2).

Global gene expression patterns in response to PhIP and MelQx

At 10 μ M or higher concentrations, PhIP and MelQx were previously shown to induce *CYP1A1*, *CYP1A2*, and *CYP1B1* expression after a 24h exposure (Dumont *et al.*, 2010). We hypothesized that additional changes in gene expression could occur after repeated exposure to 10 μ M PhIP and MelQx for 28 days in the absence of cytotoxic effects. Pangenomic Agilent microarrays were used and significantly modulated genes were extracted with $p \leq 0.01$ and 1.5-fold change as filters.

The total number of genes significantly regulated by PhIP and MelQx was 108 and 69 at 24h, and 89 and 112 at 28 days, respectively. Up-regulated genes represented 16 and 55% with PhIP and 52 and 63% with MelQx after 24h and 28 days of exposure, respectively. The Venn diagrams in figures 1A and 1B show the number of genes that were common or unique to the different treatment conditions. Only 8 and 15 genes were modulated by both PhIP and MelQx after 24h and 28 days of exposure, respectively (Figure 1A). Likewise, only 5 and 8 genes were modulated by PhIP and MelQx respectively, at the two time points (Figure 1B).

Time-dependent effects of PhIP and MelQx on gene expression profiling

Only the well-annotated genes modulated by each HAA after either 24h or 28 days of exposure (Tables 1, 2, and 3) were considered for subsequent functional analyses using IPA. Regardless of the HAA and the time of exposure, most genes had relatively small fold changes (below 2). In contrast, a 2.4- to 5.0-fold induction of *CYP1A1* and *CYP1A2*, two key genes of the AhR gene battery (Nebert *et al.*, 2000); was observed in all treatment conditions (Table 1). Only one other gene was modulated by both PhIP and MelQx at 24h, i.e. the methionine adenosyltransferase II alpha (*MAT2A*), which was down-regulated by PhIP while up-regulated by MelQx. The 10 other genes modulated by both HAA after 28 days included two additional target genes of the AhR (*CYP1B1* and *ALDH3A1*), two genes related to apoptosis (*CASP8* and *MT-CYB*) and two genes related to cell cycle and cancer (*DHRS2* and *DIAPH3*, respectively).

Otherwise, most deregulated genes were restricted to one condition. Of the 36 genes specifically modulated after 24h of exposure to PhIP (Table 2), 15 were related to “Cell death”, “Cellular growth and proliferation” and “Cancer”. *EGR1*, *F2R*, and *FOS*, which are related to the three functions, were either up-regulated (*EGR1* and *FOS*) or down-regulated (*F2R*). Genes related to cell death (apoptosis) included *NTRK1* and *S100A1*, which were up-regulated and *PDCD1*, *RAD23B*, *RAPGEF1*, and *RNF34*, which were down-regulated. In addition to *EGR1*, *F2R*, and *FOS*, 8 other genes were related to cancer: *NTRK1* and *S100A1* were induced whereas *CDK9*, *HNF1B*, *RAPGEF1*, *RIMS4*, *VPRBP* and *TBC1D2B* were repressed. Some of these genes (*CDK9*, *NTRK1*, and *VPRBP*) as well as *CYP27B1* and *PDCD1* were related to cell proliferation.

After 28 days of repeated exposure to PhIP, the biological functions “Cell death”, “Cellular growth and proliferation” and “Cancer” were enriched but included genes different from those modulated after 24h. Nineteen out of the 52 genes specifically modulated at 28 days were related to these three cellular processes (Table 3). Six genes were related to cell proliferation and apoptosis: *CXCR3*, *GAB1*, and *OSM* were up-regulated while *APAF1*, *CASP8*, and *EGF* were down-regulated. *ALOX5* and *WTAP* which were repressed and *CD27*, which was induced were other PhIP-modulated

genes related to cell death. In addition to *ALOX5*, *CASP8*, *CD27*, *CXCR3* and *EGF*, 10 other modulated genes were cancer-related: *AKAP12*, *CYP1B1*, *DIAPH3*, and *TTC37* were up-regulated while *MT-CYB*, *GNA13*, *HCCS*, *N4BP1*, *SNF1LK*, and *SRRM2* were down-regulated. In addition, 14 genes specifically modulated at 28 days were related to “Immunological disorder”. This gene set included *CHAT*, *DIAPH3*, *NAV2*, *OSM*, *PRKAR2B*, and *TDRD10*, which were up-regulated and *ALOX5*, *APAF1*, *BNC2*, *CASP8*, *CDH26*, *EGF*, *GNA13* and *SNF1LK*, which were down-regulated.

After 24h of exposure to MeIQx, the functional analysis uncovered that few functions were significantly affected. Of the 29 genes that were specifically modulated (Table 2), only 11 could be further categorized according to their known function using IPA. Four modulated genes were involved in “cellular growth and proliferation”: *TNFSF9* was induced while *LIF*, *YAP1*, and *RBBP6* were repressed. In addition, 3 of the modulated genes (*LIF*, *ABCD3* and *KIFC1*) could be related to “cellular assembly and organization”.

A total of 71 well-annotated genes were found to be specifically modulated after 28 days of repeated exposure to MeIQx (Table 3). Of the 13 MeIQx-modulated genes related to cell division process, 10 were induced (*ALDH3A1*, *ANLN*, *CDC2*, *CDC25C*, *CDK13*, *ERCC6L*, *INCENP*, *NEK2*, *RAD54L*, and *TOP2A*) whereas 3 were repressed (*DHRS2*, *FOS*, and *KLF6*). Interestingly, 34% were found to be involved in cancer; in addition to *ALDH3A1*, *CDC2*, *FOS*, *KLF6*, *NEK2*, and *TOP2A*, other cancer-related genes included: *ADORA2B*, *CEP55*, *CYP1B1*, *DIAPH3*, *KIF1B*, *MKI67*, *ORC1L*, *RRM2*, *S100A2*, *SLC7A11*, and *UHRF1* which were up-regulated and *EGR1*, *FAM153A*, *MT-CYB*, *NR0B2*, *SLC2A14*, *VAMP1* and *VIL1* which were down-regulated. Moreover, IPA identified 20 MeIQx-modulated genes as involved in inflammatory disorders. This gene set comprised some genes previously described as involved in cancer, i.e. *ADORA2B*, *DIAPH3*, *EGR1*, *FAM153A*, *FOS*, *RAD54L*, *RRM2*, *SLC7A11*, *TOP2A*, and *VAMP1*. It also included *COL9A2*, *GPATCH1*, *INPP5D*, *LAMA1*, *LRRC58*, and *RAD51AP1* which were induced and *ARG1*, *C1QTNF7*, *CSGALNACT1*, and *CLYBL* which were repressed.

Validation of HAA target genes by RT-qPCR

Ten HAA target genes from our microarray data were next validated by RT-qPCR (Supplemental Table S2). These genes were selected on the basis of the following criteria: (i) genes displaying the highest fold changes in the same functional pathway (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* and *ALDH3A1*), (ii) genes previously reported in the literature to be regulated by HAA (*CDC2*, *TOP2A*, *RAPGEF1* and *RAD23B*) and (iii) genes modulated by both PhIP and MeIQx after a 28 days exposure (*CASP8* and *MT-CYB*). Except for *RAD23B* and *RAPGEF1*, induction or repression found by microarray analysis was confirmed by RT-qPCR. Consistent with microarray analysis, the highest fold changes were observed for members of the AhR gene battery, i.e. *ALDH3A1*, *CYP1A1*, *CYP1A2* and *CYP1B1*. The fold induction of these genes remained relatively similar between 24h and 28 days of exposure, and was higher with MeIQx than with PhIP (Supplemental Table S2). This greater responsiveness to MeIQx was confirmed by a dose-response qPCR analysis showing a significant induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* by a 1 μ M concentration (data not shown). Otherwise, RT-qPCR

analysis confirmed that most of the other investigated transcripts displayed small fold changes ($1.3 \leq FC \leq 1.5$, except for *MT-CYB*).

Involvement of AhR in CYP1A induction by PhIP and MelQx

Previous analyses identified some AhR target genes, including *CYP1A1* and *CYP1A2*, as the most strongly regulated genes in response to PhIP and MelQx. To test the possible involvement of the AhR in HAA-mediated induction of *CYP1* family, HepaRG cells were co-treated by PhIP and/or MelQx and ANF, an AhR antagonist (Figure 2A). Induction of *CYP1A1* and *1A2* transcripts by PhIP and MelQx was inhibited in the presence of 1 μ M ANF and completely abolished after a co-treatment with 10 μ M of ANF. The involvement of the AhR was further evaluated using siRNA methodology (Figure 2B). Transfection of differentiated HepaRG cells with siRNA directed against the AhR (siAhR) resulted in an 80% reduction of AhR protein levels in all treatment conditions, thus decreasing *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNA up-regulation. Furthermore, to determine whether the *CYP1A1* mRNA up-regulation by HAA resulted from a modification of the gene promoter activity, HepaRG cells were transfected with a pCYP1A1(-1566) construct containing 1566 bp of the *CYP1A1* gene 5'-flanking region upstream of the luciferase gene. A 21 and 73% increase in the luciferase activity was observed in cells treated with 10 μ M PhIP and 10 μ M MelQx, respectively (Figure 3). HepaRG cells were also transfected with a construct containing a luciferase reporter gene (pGL3-XRE3) driven by three xenobiotic responsive elements (XRE), the classical recognition motif of the AhR/ARNT complex. The XRE-driven luciferase activity was found to be slightly increased by PhIP and MelQx (15 and 27%, respectively). We also compared the levels of induction obtained with PhIP and MelQx with those obtained with 3-MC, a prototypical AhR agonist which induced *CYP1A1* expression. 3-MC triggered a 4.1- and 1.9-fold increase in luciferase activity of the pCYP1A1(-1566) and pGL3-XRE3 constructs, respectively (Figure 3). These results suggest that HAA are much less potent than 3-MC at inducing *CYP1A1* gene promoter activity.

DISCUSSION

In the present study, the transcriptional response of the metabolically competent human HepaRG cells was examined after either a single (24-h) or a repeated (28-day) exposure to 10 μ M PhIP or MelQx. Both time- and compound-specific alterations of gene expression were evidenced. However, the most important changes concerned several well-known AhR target genes. Accordingly, *CYP1A1* and *CYP1A2* were induced *via* activation of the AhR pathway at relatively similar levels regardless of the exposure time and the compound. In addition, two other AhR target genes, i.e. *CYP1B1* and *ALDH3A1*, were shown to be induced after a repeated treatment.

The AhR gene battery comprises some major genes involved in metabolism of exogenous and endogenous substrates, especially *CYP1A1*, *1A2* and *1B1* and several non-P450 genes including *ALDH3A1*, *GSTA1*, *NQO1*, and *UGT1A6* (Nebert *et al.*, 2000; Nebert *et al.*, 2004). Noteworthy, the 4 most induced genes in our conditions, i.e. *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, and *ALDH3A1*, were also the

most induced genes in rat liver treated with dioxin or aroclor 1254 (two potent AhR activators) for 4 days using a microarray approach (Silkworth *et al.*, 2008). In contrast, other major genes of the AhR battery, such as *GSTA1*, *UGT1A6* and *NQO1* remained unchanged even after repeated treatment. Interestingly, it has been shown that in contrast to the other members of the AhR gene battery, these three genes required nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) for induction by dioxin in mouse liver (Yeager *et al.*, 2009). Altogether, these data support the conclusion that HAA may be ligands for AhR but not for activating Nrf2.

Only two previous studies using animal models had suggested the involvement of AhR in Cyp1a induction by HAA (Kleman *et al.*, 1990; Kleman *et al.*, 1992). These authors showed a significant binding affinity of PhIP for AhR in rat liver but 100-fold weaker than with 3-MC (Kleman *et al.*, 1990) and a dose-dependent DNA binding affinity for the XRE sequence motif induced by PhIP and MeIQx using a gel-retardation assay in mouse Hepa 1c1c7 cells (Kleman *et al.*, 1992). Here, we brought the evidence that AhR was also activated in human HepaRG cells by both PhIP and MeIQx using several approaches. Indeed, induction of *CYP1A1/1A2* by PhIP and MeIQx was down-regulated in the presence of the AhR antagonist ANF and by knockdown of AhR expression using siRNAs. In addition, the use of luciferase reporter constructs showed that the two HAA induced the XRE-containing 5'-flanking region of the *CYP1A1* gene and to a lesser extent the XRE-driven luciferase activity. However, HAA are obviously weak AhR ligands compared to 3-MC, a prototypical AhR agonist. In addition, although a significant induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* transcripts was detected in response to both HAA, no obvious increase in corresponding enzymatic activity was observed in the present study (data not shown). In agreement with this observation, in humans fed for several days with pan-fried or charcoal-grilled meat containing high amounts of HAA, the increase in *CYP1A1* and/or *CYP1A2* activity was very low compared to the increase observed at the transcript and protein levels (Sinha *et al.*, 1994; Fontana *et al.*, 1999).

In addition to the members of the AhR gene battery, only a few additional genes were found to be modulated by both PhIP and MeIQx. Thus, *MAT2A* was the only other deregulated gene after a single exposure for 24h; it was repressed by PhIP and induced by MeIQx. Down-regulation of this gene has been related to inhibition of cell growth in hepatoma cells (Liu *et al.*, 2007) while an overexpression has been observed in human hepatocellular carcinoma (HCC) and liver cancer cell lines (Cai *et al.*, 1998). After 28 days of repeated exposure, 8 additional genes were found to be similarly modulated by both PhIP and MeIQx in HepaRG cells. Among genes with known function, *CASP8* is a key signaling molecule of apoptosis (Fulda, 2009). Intriguingly, it has been shown a *CASP8*-dependent cleavage of MT-CYB resulting in the translocation of its C-terminal half into the cytoplasm, and therefore in the activation of caspases executing apoptosis (Komarov *et al.*, 2008). In addition, overexpression of *CLDN14* was recently shown to induce cell death (Hu *et al.*, 2009). In this context, it might be hypothesized that down-regulation of *CASP8*, *CLDN14* and *MT-CYB* by HAA might result in the inability of HepaRG cells to undergo apoptosis in response to signals that normally restrain uncontrolled growth.

Deregulation of most other genes was time-dependent and compound-specific with fold-changes that generally did not exceed 2. Regarding the transcriptional response to PhIP, 42 and 33%

of the modulated genes were related to cell death, cellular growth and proliferation, and cancer after 24h and 28 days, respectively. Nevertheless, although some similar functions were enriched after both time points, genes involved in such functions were distinct. By studying the differential transcriptional response between susceptible and resistant rats to mammary gland carcinogenesis, Shan *et al.* consistently showed that a number of modulated genes were related to cell growth and apoptosis after both 3h and 6 weeks of exposure to PhIP but most of these deregulated genes were different between both time points (Shan *et al.*, 2004). Moreover, some genes associated with the Ras superfamily, including *RAD23B* and *RAPGEF1*, were modulated especially in rats susceptible to mammary gland carcinogenesis. In our microarray analysis, both genes were also found to be modulated by PhIP at 24h. However, RT-qPCR experiments failed to confirm this result, probably due to the fact that both transcripts displayed fold changes that did not exceed 1.5 in the microarray experiments. Collectively, previous results and the present study suggest that PhIP may exert early carcinogenic effects both in animal and human models.

In contrast to PhIP, the number of MelQx-regulated genes in HepaRG cells significantly increased with the exposure time. Functional analysis identified cell cycle and cancer as the most significantly altered functions after a 28 days exposure to MelQx. More than one third of the MelQx-modulated genes were cancer-related genes. Among them, *CDC2* and *TOP2A*, which were up-regulated, have been shown to correlate with more aggressive HCC phenotype (Ito *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2009). *CEP55* and *MKI67*, which are overexpressed in different human tumors including HCC (Chen *et al.*, 2007; Koskinas *et al.*, 2005), were also specifically up-regulated at 28 days. After long-term exposure, MelQx decreased expression of *EGR1*, *KLF6* and *NR0B2* which are suspected to act as tumor suppressor genes in HCC (Hao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008). To our knowledge, only one previous study has described the transcriptional effect of MelQx using the microarray technique. Only transcript profiles in MelQx-induced hepatocellular adenomas and HCC after 104 weeks of rat treatment greatly differed from those of normal liver and functional analysis identified the cell cycle pathway as particularly enriched (Kang *et al.*, 2007). Consistently, the present study indicates that genes related to cell cycle progression and cancer were modulated only after a prolonged exposure to MelQx. In addition, *CDC2* and *TOP2A* were found to be up-regulated in both MelQx-induced HCC in rats (Kang *et al.*, 2007) and HepaRG cells after a prolonged exposure. Altogether, these results are in accordance with long-term carcinogenesis studies performed in rodents (Sugimura *et al.*, 2004), and support a role for MelQx in human carcinogenesis after a prolonged exposure only.

As expected, significant differences in HAA-modulated genes were also observed between transcriptome data obtained from rats and human HepaRG cells. In contrast to the present study, a number of genes encoding ribosomal, proteasome and heat-shock proteins were overexpressed in PhIP-treated rats (Shan *et al.*, 2004; Fujiwara *et al.*, 2003) and several genes related to glutathione metabolism were modulated in MelQx-induced HCC in rats (Kang *et al.*, 2007). To explain this discrepancy between the human and rat transcriptome responses to HAA, at least three hypotheses can be advanced: (i) the dissimilarity between rat and human metabolism of HAA (Langouet *et al.*, 2002); (ii) the existence of tissue- and species-specific gene expression patterns and (iii) the dosage

used in animal experiments, which was much higher than the concentrations tested in the present study. The 10 μ M (i.e. 2000 ng/g) HAA concentration used for our transcriptomic analyses was relatively high compared to the HAA dose to which humans might be exposed through their diet since HAA concentration in fried or grilled meat ranges from a few ng/g to several hundred ng/g (Felton *et al.*, 1997). However, it has been suggested that daily intake of HAA may vary considerably depending on dietary habits and cooking practice (Keating *et al.*, 2001). In addition, we detected a significant induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* expression by MeIQx at a concentration as low as 1 μ M (data not shown), highlighting the potential relevance of our data towards environmental exposure. At 10 μ M, relatively small changes ($FC < 2$) in the expression patterns of cancer-related genes were observed in HepaRG cells treated with PhIP or MeIQx despite a repeated exposure for 4 weeks. This is in accordance with the fact that the induction of tumours in rats required chronic doses of 25–400 ppm in the food (Sugimura *et al.*, 2004) and HAA-induced genotoxicity in human cell lines usually needed concentrations reaching several hundred μ M (Knasmüller *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 2008).

Most genes deregulated by PhIP or MeIQx were related to cell growth and proliferation, apoptosis, and cancer. Interestingly, it is now well established that in addition to its major role in regulation of xenobiotic metabolism, AhR is also involved in various cellular processes such as stress response, cell cycle regulation, apoptosis as well as tumor promotion and progression (Nebert *et al.*, 2000; Barouki *et al.*, 2007; Dietrich *et al.*, 2010). However, it is likely that some gene expression changes after HAA treatment occurred independently of AhR activation, but rather resulting from HAA metabolism and its consequences. Further studies are required to distinguish between the AhR-dependent and independent transcriptional effects of HAA.

In conclusion, the most significant gene expression changes in response to PhIP and MeIQx concern members of the AhR gene battery, including *CYP1A1* and *CYP1A2*, which encode two enzymes closely involved in HAA bioactivation. In addition, we identified a number of genes with lower fold changes, including cancer-related genes, whose expression was differentially targeted by PhIP and MeIQx. This first study estimating the long-term effects of HAA in a human cell line supports the hypothesis that human cancer may be due, at least in part, to the intake of these contaminants in diet. Our results also suggest that HAA may act in concert with other AhR-activating chemicals found in significant amounts in food and environment, including polycyclic aromatic hydrocarbons. Lastly, it encourages the use of low concentrations of HAA in order to estimate their carcinogenic potential in humans.

Acknowledgments

We acknowledge the ImPACcell and the Biogenouest transcriptomic platforms (Rennes), and the Biogenouest/IBiSA SynNanoVect platform (Brest-Rennes) for helping with transfection experiments. This work was supported by grants from ANR (contract 06SEST17) and the Ligue 35 contre le Cancer.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Alaejos, M. S., Gonzalez, V., and Afonso, A. M. (2008). Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: a review. *Food Addit. Contam Part A Chem Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25, 2-24.
2. Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 34, 75-83.
3. Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P. M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581, 3608-3615.
4. Cai, J., Mao, Z., Hwang, J. J., and Lu, S. C. (1998). Differential expression of methionine adenosyltransferase genes influences the rate of growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 1444-1450.
5. Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology.* 45, 957-967.
6. Chen, C. H., Lu, P. J., Chen, Y. C., Fu, S. L., Wu, K. J., Tsou, A. P., Lee, Y. C., Lin, T. C., Hsu, S. L., Lin, W. J., Huang, C. Y., and Chou, C. K. (2007). FLJ10540-elicited cell transformation is through the activation of PI3-kinase/AKT pathway. *Oncogene.* 26, 4272-4283.
7. Dietrich, C., and Kaina, B. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis.* In press.
8. Dumont, J., Josse, R., Lambert, C., Antherieu, S., Le Hegarat, L., Aninat, C., Robin, M. A., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2010). Differential toxicity of heterocyclic aromatic amines and their mixture in metabolically competent HepaRG cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 256-63.
9. Ellinger-Ziegelbauer, H., Aubrecht, J., Kleinjans, J. C., and Ahr, H. J. (2009). Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Lett.* 186, 36-44.
10. Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Andresen, B. D., Bjeldanes, L. F., and Hatch, F. T. (1986). Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ. Health Perspect.* 67, 17-24.
11. Felton, J. S., Malfatti, M. A., Knize, M. G., Salmon, C. P., Hopmans, E. C., and Wu, R. W. (1997). Health risks of heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 376, 37-41.
12. Fielden, M. R., Nie, A., McMillian, M., Elangbam, C. S., Trela, B. A., Yang, Y., Dunn, R. T., Dragan, Y., Fransson-Stehen, R., Bogdanffy, M., Adams, S. P., Foster, W. R., Chen, S. J., Rossi, P., Kasper, P., Jacobson-Kram, D., Tatsuoka, K. S., Wier, P. J., Gollub, J., Halbert, D. N., Roter, A., Young, J. K., Sina, J. F., Marlowe, J., Martus, H. J., Aubrecht, J., Olaharski, A. J., Roome, N., Nioi, P., Pardo, I., Snyder, R., Perry, R., Lord, P., Mattes, W., and Car, B. D. (2008). Interlaboratory evaluation of genomic signatures for predicting carcinogenicity in the rat. *Toxicol. Sci.* 103, 28-34.
13. Fontana, R. J., Lown, K. S., Paine, M. F., Fortlage, L., Santella, R. M., Felton, J. S., Knize, M. G., Greenberg, A., and Watkins, P. B. (1999). Effects of a chargrilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology.* 117, 89-98.
14. Fujiwara, K., Ochiai, M., Ubagai, T., Ohki, M., Ohta, T., Nagao, M., Sugimura, T., and Nakagama, H. (2003). Differential gene expression profiles in colon epithelium of two rat strains with distinct susceptibility to colon carcinogenesis after exposure to PhIP in combination with dietary high fat. *Cancer Sci.* 94, 672-678.

15. Fulda, S. (2009). Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* 281, 128-133.
16. Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 99, 15655-15660.
17. Hao, M. W., Liang, Y. R., Liu, Y. F., Liu, L., Wu, M. Y., and Yang, H. X. (2002). Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 8, 203-207.
18. He, N., Park, K., Zhang, Y., Huang, J., Lu, S., and Wang, L. (2008). Epigenetic inhibition of nuclear receptor small heterodimer partner is associated with and regulates hepatocellular carcinoma growth. *Gastroenterology.* 134, 793-802.
19. Hu, Y., Lehrach, H., and Janitz, M. (2009). Apoptosis screening of human chromosome 21 proteins reveals novel cell death regulators. *Mol Biol Rep.* In press.
20. Ito, Y., Takeda, T., Sakon, M., Monden, M., Tsujimoto, M., and Matsuura, N. (2000). Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 59, 68-74.
21. Josse, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J. M., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos.* 36, 1111-1118.
22. Kang, J. S., Wanibuchi, H., Murai, T., Morimura, K., Kinoshita, A., and Fukushima, S. (2007). Analysis of gene expression in different stages of MelQx-induced rat hepatocarcinogenesis. *Oncol.Rep.* 17, 747-752.
23. Keating, G. A., and Bogen, K. T. (2001). Methods for estimating heterocyclic amine concentrations in cooked meats in the US diet. *Food Chem Toxicol.* 39, 29-43.
24. Kleman, M., Overvik, E., Mason, G., and Gustafsson, J. A. (1990). Effects of the food mutagens MelQx and PhIP on the expression of cytochrome P450IA proteins in various tissues of male and female rats. *Carcinogenesis.* 11, 2185-2189.
25. Kleman, M. I., Overvik, E., Mason, G. G., and Gustafsson, J. A. (1992). In vitro activation of the dioxin receptor to a DNA-binding form by food-borne heterocyclic amines. *Carcinogenesis.* 13 , 1619-1624.
26. Knasmuller, S., Schwab, C. E., Land, S. J., Wang, C. Y., Sanyal, R., Kundi, M., Parzefall, W., and Darroudi, F. (1999). Genotoxic effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis.* 14, 533-540.
27. Komarov, A. P., Rokhlin, O. W., Yu, C. A., and Gudkov, A. V. (2008). Functional genetic screening reveals the role of mitochondrial cytochrome b as a mediator of FAS-induced apoptosis. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 105, 14453-14458.
28. Koskinas, J., Petraki, K., Kavantzias, N., Rapti, I., Kountouras, D., and Hadziyannis, S. (2005). Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 12, 635-641.
29. Lambert, C. B., Spire, C., Claude, N., and Guillouzo, A. (2009). Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 234, 345-360.

30. Langouet, S., Paehler, A., Welte, D. H., Kerriguy, N., Guillouzo, A., and Turesky, R. J. (2002). Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis*. 23, 115-122.
31. Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S., Ribault, C., Benvegna, T., Jaffres, P. A., and Loyer, P. (2010). Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol.J.* 5, 314-320.
32. Le Ferrec, E., Lagadic-Gossman, D., Rauch, C., Bardiau, C., Maheo, K., Massiere, F., Le Vee, M., Guillouzo, A., and Morel, F. (2002). Transcriptional induction of CYP1A1 by oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent. *J Biol Chem*. 277, 24780-24787.
33. Liu, Q., Wu, K., Zhu, Y., He, Y., Wu, J., and Liu, Z. (2007). Silencing MAT2A gene by RNA interference inhibited cell growth and induced apoptosis in human hepatoma cells. *Hepatol.Res.* 37, 376-388.
34. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., and Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*. 279, 23847-23850.
35. Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., and Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 59, 65-85.
36. Shan, L., Yu, M., Schut, H. A., and Snyderwine, E. G. (2004). Susceptibility of rats to mammary gland carcinogenesis by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) varies with age and is associated with the induction of differential gene expression. *Am J Pathol*. 165, 191-202.
37. Silkworth, J. B., Carlson, E. A., McCulloch, C., Illouz, K., Goodwin, S., and Sutter, T. R. (2008). Toxicogenomic analysis of gender, chemical, and dose effects in livers of TCDD- or aroclor 1254-exposed rats using a multifactor linear model. *Toxicol.Sci.* 102, 291-309.
38. Sinha, R., Rothman, N., Brown, E. D., Mark, S. D., Hoover, R. N., Caporaso, N. E., Levander, O. A., Knize, M. G., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F. (1994). Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Res*. 54, 6154-6159.
39. Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., and Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci*. 95, 290-299.
40. Tsujimura, K., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa, K., and Shirai, T. (2006). Prediction of carcinogenic potential by a toxicogenomic approach using rat hepatoma cells. *Cancer Sci*. 97, 1002-1010.
41. Turesky, R. J., Guengerich, F. P., Guillouzo, A., and Langouet, S. (2002). Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutat.Res.* 506-507, 187-195.
42. van Delft, J. H., van Agen, E., van Breda, S. G., Herwijnen, M. H., Staal, Y. C., and Kleinjans, J. C. (2005). Comparison of supervised clustering methods to discriminate genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Mutat.Res.* 575, 17-33.
43. Wang, S. P., Zhou, H. J., Chen, X. P., Ren, G. Y., Ruan, X. X., Zhang, Y., Zhang, R. L., and Chen, J. (2007). Loss of expression of Kruppel-like factor 6 in primary hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *J Exp.Clin Cancer Res*. 26, 117-124.
44. Winter, H. K., Ehrlich, V. A., Grusch, M., Lackner, A., Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., Mikulits, W., and Knasmüller, S. (2008). Use of four new human-derived liver-cell lines for the

detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat.Res.* 657, 133-139.

45. Wong, N., Yeo, W., Wong, W. L., Wong, N. L., Chan, K. Y., Mo, F. K., Koh, J., Chan, S. L., Chan, A. T., Lai, P. B., Ching, A. K., Tong, J. H., Ng, H. K., Johnson, P. J., and To, K. F. (2009). TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J Cancer.* 124, 644-652.
46. Yeager, R. L., Reisman, S. A., Aleksunes, L. M., and Klaassen, C. D. (2009). Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol.Sci.* 111, 238-246.

Table 1: Well-annotated genes modulated by both PhIP and MelQx after either 24h or 28 days of exposure

Time of exposure	Gene Symbol	Description	Gene ID	PhIP	MelQx
24h	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	NM_000499	3.74	2.80
	CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	NM_000761	2.39	2.38
	MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_005911	-1.79	1.51
28 days	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	NM_000691	1.62	1.61
	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_033356	-1.54	-1.57
	CDK13	cyclin-dependent kinase 13	NM_031267	1.89	1.60
	CFHR4	complement factor H-related 4	NM_006684	-1.61	-1.54
	CLDN14	claudin 14	NM_144492	-1.52	-2.06
	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	NM_000499	4.27	4.97
	CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	NM_000761	2.56	2.57
	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	NM_000104	1.63	2.20
	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	NM_182908	-1.65	-1.57
	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	NM_001042517	1.61	2.18
	KCTD2	potassium channel tetramerisation domain containing 2	NM_015353	1.56	1.63
	MT-CYB	mitochondrially encoded cytochrome b	P00156*	-1.98	-1.93

*UniProtKB/Swiss-Prot accession number.

Table 2: Well-annotated genes specifically modulated after 24h of exposure

HAA	Gene Symbol	Description	Gene ID	FC
PhIP	ANKRD21	ankyrin repeat domain 21	NM_174981	-1.59
	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	NM_181435	-1.53
	CDK9	Cyclin- dependent kinase 9	NM_001261	-1.51
	CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1	NM_000785	-1.57
	DNAJB8	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8	NM_153330	1.56
	EGR1	early growth response 1	NM_001964	1.65
	F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	NM_001992	-1.54
	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	NM_005252	1.70
	GPR135	G protein-coupled receptor 135	NM_022571	-1.51
	GRM3	glutamate receptor, metabotropic 3	NM_000840	-1.53
	GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4	NM_000841	1.60
	GUSBL2	glucuronidase, beta-like 2	NM_206908	-1.55
	HNF1B	HNF1 homeobox B	NM_000458	-1.78
	HSFX1	heat shock transcription factor family, X linked 1	NM_016153	-1.51
	LRRIQ3	leucine-rich repeats and IQ motif containing 3	NM_001105659	-1.52
	MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_005911	-1.79
	NTRK1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	NM_002529	1.53
	ODF4	outer dense fiber of sperm tails 4	NM_153007	-1.56
	PAQR7	progesterin and adipoQ receptor family member VII	NM_178422	-1.53
	PDCD1	programmed cell death 1	NM_005018	-1.59
	RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	NM_002874	-1.51
	RAPGEF1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	NM_198679	-1.53
	RBM14	RNA binding motif protein 14	NM_006328	-2.06
	RIMS4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	NM_182970	-1.68
	RNF34	ring finger protein 34	NM_194271	-1.67
	RPGR	retinitis pigmentosa GTPase regulator	NM_000328	-1.61
	S100A1	S100 calcium binding protein A1	NM_006271	1.60
	SLAIN2	SLAIN motif family, member 2	NM_020846	-1.57
	SPG3A	spastic paraplegia 3A (autosomal dominant)	NM_015915	1.60
	SYNGR3	synaptogyrin 3	NM_004209	-1.66
	TBC1D2B	TBC1 domain family, member 2B	NM_015079	-1.62
	SPDYE3	speedy homolog E3 (Xenopus laevis)	NM_001004351	-1.71
	VPRBP	Vpr (HIV-1) binding protein	NM_014703	-1.57
	YTHDC1	YTH domain containing 1	NM_001031732	-1.58
	ZNF624	zinc finger protein 624	NM_020787	-1.69
	ZNF654	zinc finger protein 654	NM_018293	-1.54
MeIQx	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	NM_002858	1.64
	ADSS	adenylosuccinate synthase	NM_001126	-1.71
	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	NM_181861	1.54
	CACNA1D	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	NM_000720	-1.52
	CCDC47	coiled-coil domain containing 47	NM_020198	-1.51
	DMXL2	Dmx-like 2	NM_015263	-1.78
	GJE1	gap junction protein, epsilon 1, 29kDa	BC043381	1.51
	GNAT1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	NM_000172	-1.51
	HIPK3	homeodomain interacting protein kinase 3	NM_005734	-1.60
	IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	NM_002183	2.01
	IMPG2	interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	NM_016247	-1.60
	KIFC1	kinesin family member C1	NM_002263	-1.55
	LIF	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	NM_002309	-1.56
	MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha	NM_005911	1.51
	PDZD7	PDZ domain containing 7	NM_024895	-1.68
	PIP5KL1	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1	NM_173492	-1.56
	RBBP6	retinoblastoma binding protein 6	BC051317	-1.53
	RNF125	ring finger protein 125	NM_017831	1.93
	RNF186	ring finger protein 186	NM_019062	-1.56
	SERPIN2	serpin peptidase inhibitor, clade I (pancrin), member 2	NM_006217	-1.62
	SLC15A1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	NM_005073	-1.52
	TAS2R49	taste receptor, type 2, member 49	NM_176889	-1.74
	TBC1D25	TBC1 domain family, member 25	NM_002536	1.80
	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	NM_003811	1.55
	UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	NM_194458	1.58
	WBSR19	Williams Beuren syndrome chromosome region 19	NM_175064	-1.55
	YAP1	Yes-associated protein 1, 65kDa	NM_006106	-1.70
	ZNF343	zinc finger protein 343	NM_024325	1.82
	ZNF799	Zinc finger protein 799	NM_001080821	1.63

Modulated genes that are not compound-specific are indicated in bold. FC: fold change.

Table 3: Well-annotated genes specifically modulated after 28 days of exposure

HAA	Gene Symbol	Description	Gene ID	FC
PhIP	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	NM_144497	1.51
	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	NM_000698	-1.59
	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	NM_181861	-1.52
	ATF7IP	activating transcription factor 7 interacting protein	NM_018179	1.99
	BNC2	basonuclin 2	NM_017637	-1.55
	CAB39L	calcium binding protein 39-like	NM_030925	-1.51
	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_033356	-1.54
	CD27	CD27 molecule	NM_001242	1.53
	CDH26	cadherin-like 26	NM_021810	-1.59
	CDK13	cyclin-dependent kinase 13	NM_031267	1.89
	CEP290	centrosomal protein 290kDa	NM_025114	1.70
	CFHR4	complement factor H-related 4	NM_006684	-1.61
	CHAT	choline acetyltransferase	NM_020549	1.57
	CLDN14	claudin 14	NM_144492	-1.52
	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	NM_001504	1.58
	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	NM_000104	1.63
	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	NM_182908	-1.59
	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	NM_001042517	1.61
	DIDO1	death inducer-obliterator 1	NM_080797	-1.66
	EGF	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	NM_001963	-1.76
	FNBP1L	formin binding protein 1-like	NM_017737	1.56
	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	NM_207123	1.51
	GNA13	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	NM_006572	-1.58
	GNAT1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	NM_000172	1.55
	GOLGA8A	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	NM_181077	-1.64
	HCCS	holocytochrome c synthase (cytochrome c heme-lyase)	NM_005333	-1.57
	HEMK1	HemK methyltransferase family member 1	NM_016173	-1.64
	IFRG15	interferon responsive gene 15	NM_022347	1.87
	KCTD2	potassium channel tetramerisation domain containing 2	NM_015353	1.56
	LCN15	lipocalin 15	NM_203347	-1.67
	MT-CYB	mitochondrially encoded cytochrome b	P00156*	-1.98
	MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	NM_012330	1.50
	N4BP1	Nedd4 binding protein 1	NM_153029	-1.54
	NAV2	neuron navigator 2	NM_182964	1.51
	NKG7	natural killer cell group 7 sequence	NM_005601	1.73
	OSM	oncostatin M	NM_020530	1.62
	PDZD7	PDZ domain containing 7	NM_024895	1.52
	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	NM_002736	1.61
	RNF186	ring finger protein 186	NM_019062	-1.54
	RPGRIP1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	NM_020366	1.55
	SNF1LK	SNF1-like kinase	NM_173354	-1.52
	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2	NM_016333	1.51
	STON2	stonin 2	NM_033104	1.74
	TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa	NM_004606	1.54
	TDRD10	tudor domain containing 10	NM_182499	1.54
	TMC8	transmembrane channel-like 8	NM_152468	1.51
	TTC37	tetratricopeptide repeat domain 37	NM_014639	1.61
	TTL	tubulin tyrosine ligase	NM_153712	1.64
	TXNDC6	thioredoxin domain containing 6	NM_178130	1.57
	WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	NM_004906	-1.53
	XPNPEP2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	NM_003399	1.58
	ZNF342	zinc finger protein 342	NM_145288	-1.63
MeIQx	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	NM_020297	-1.56
	ACSS1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	NM_032501	-1.52
	ADORA2B	adenosine A2b receptor	NM_000676	1.64
	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	NM_000691	1.61
	ANKRD21	ankyrin repeat domain 21	NM_174981	1.61
	ANLN	anillin, actin binding protein	NM_018685	1.55
	ARG1	arginase, liver	NM_000045	-1.51
	ATP11B	ATPase, Class VI, type 11B	NM_014616	1.51
	C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	NM_031911	-1.88
	CASC5	cancer susceptibility candidate 5	NM_170589	1.63

Modulated genes that are not compound-specific are indicated in bold. *UniProtKB/Swiss-Prot accession number. FC: fold change.

Figure legends

Figure 1. Identification of differentially expressed genes in HepaRG cells treated by PhIP or MelQx, for 24h and 28 days.

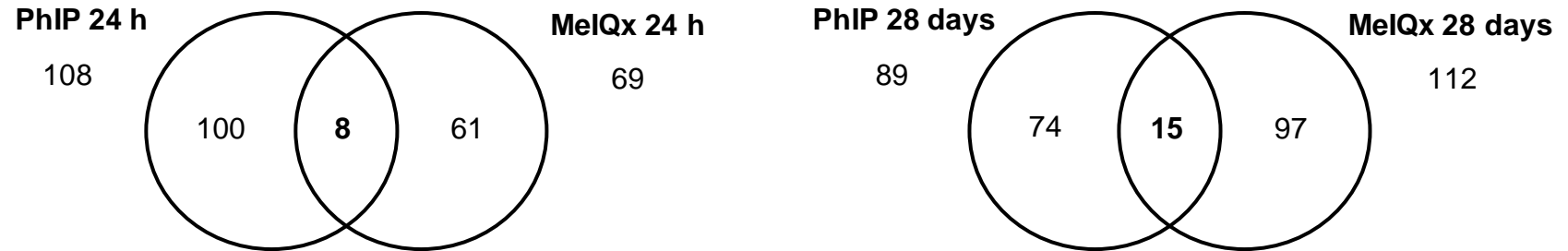
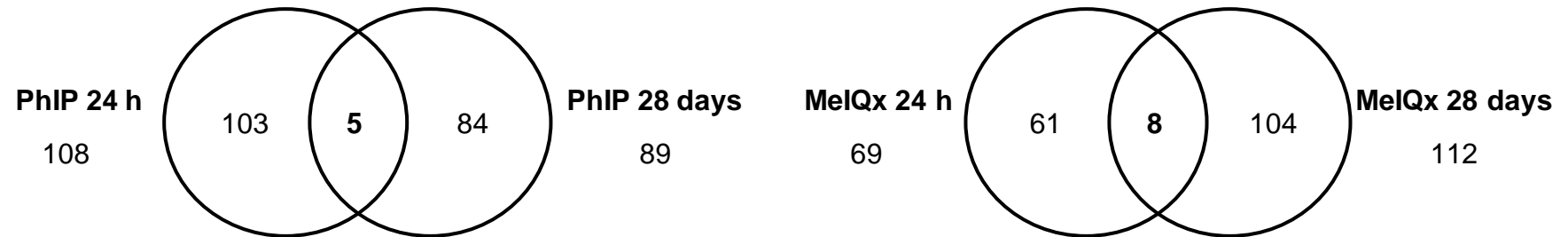
- (A) Venn diagrams depicting the differentially expressed genes between PhIP and MelQx, either after 24h or 28 days of exposure
- (B) Venn diagrams depicting the differentially expressed genes between 24 h and 28 days of exposure to PhIP or MelQx.

Figure 2. Role of AhR in HAA-induced CYP1A2 and CYP1A1 expression in HepaRG cells.

- (A) HepaRG cells were maintained under control conditions (DMSO) or treated with 10 μ M HAA for 24h in the presence or absence of 1 and 10 μ M ANF. Total RNA was isolated from control and treated cells and mRNA levels of CYP1A2 and CYP1A1 were estimated by RT-qPCR. Data represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. All results are expressed relative to the levels found in the control cells, arbitrarily set at the value of 1. * p <0.05 compared to cells not treated with ANF.
- (B) HepaRG cells transfected either with siRNA directed against AhR (siAhR) or with a non-targeting siRNA (siControl, used as siRNA transfection control), were exposed to DMSO, 10 μ M PhIP or 10 μ M MelQx, for 24 h. mRNA levels of CYP1A2 and CYP1A1 were estimated by RT-qPCR. AhR knock-down efficiency was validated at protein level by western blotting. Data represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. All results are expressed relative to the levels found in the control cells (DMSO), arbitrarily set at the value of 1. * p <0.05 compared to siControl samples.

Figure 3. Effect of PhIP and MelQx on CYP1A1 promoter activity in transiently transfected HepaRG cells

Luciferase activity in HepaRG cells transiently transfected with pCYP1A1(-1566) and pGL3-XRE3 luciferase constructs. pCYP1A1(-1566) construct consists of the firefly luciferase gene controlled by the CYP1A1 gene 5'-flanking region whereas pGL3-XRE3 contains three XRE sites upstream of the SV40 promoter of pGL3 promoter. Twenty-four hours after transfection, HepaRG cells were either maintained under control conditions (DMSO) or treated with 10 μ M HAA. 3-MC (0.5 μ M) was used as a positive control. Luciferase activity has been normalized to that of co-transfected plasmid that expressed *Renilla* luciferase. Data represent the means \pm S.E.M. of four independent experiments. All results are expressed relative to the levels found in the control cells, arbitrarily set at the value of 1. * p <0.05 compared to respective control cells (DMSO).

A**B****Figure 1**

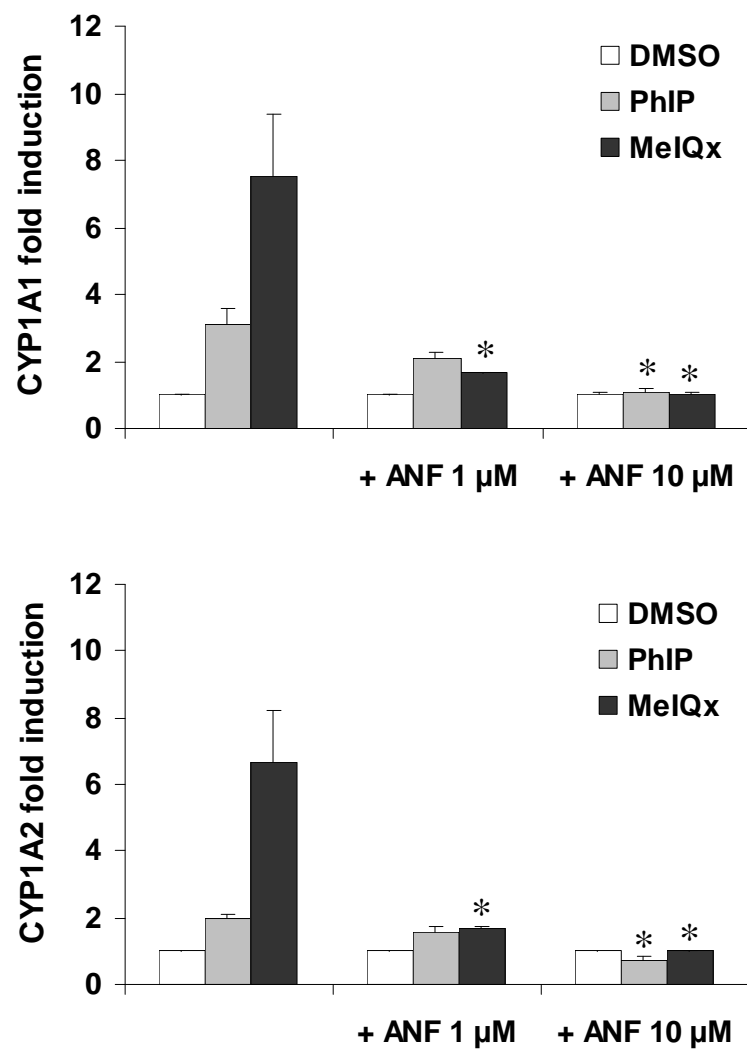
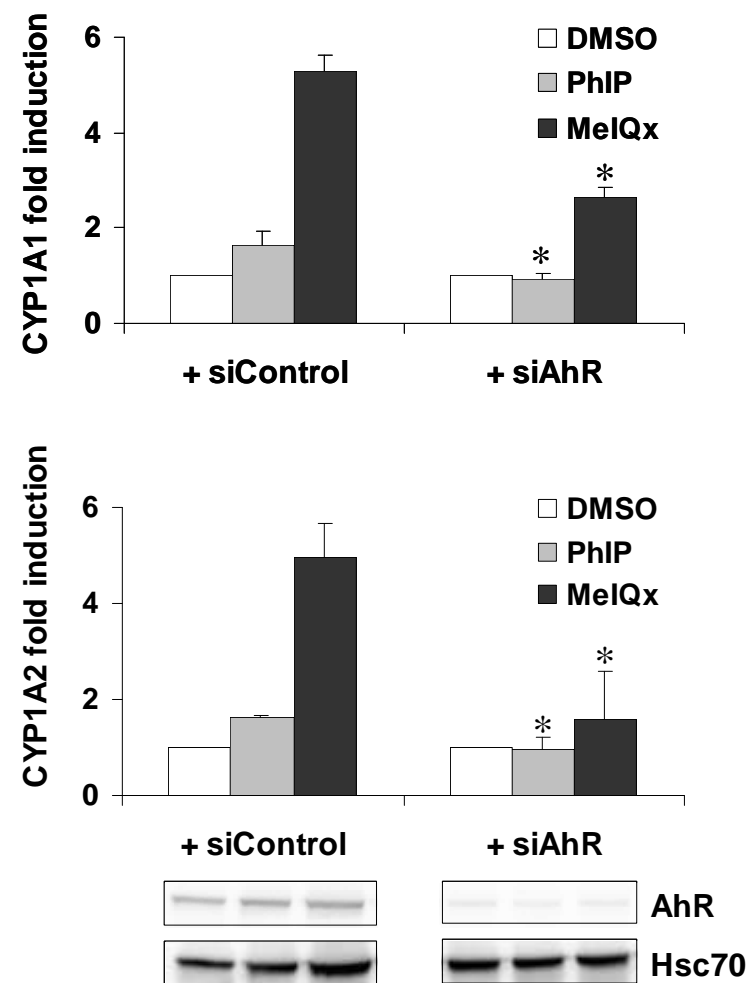
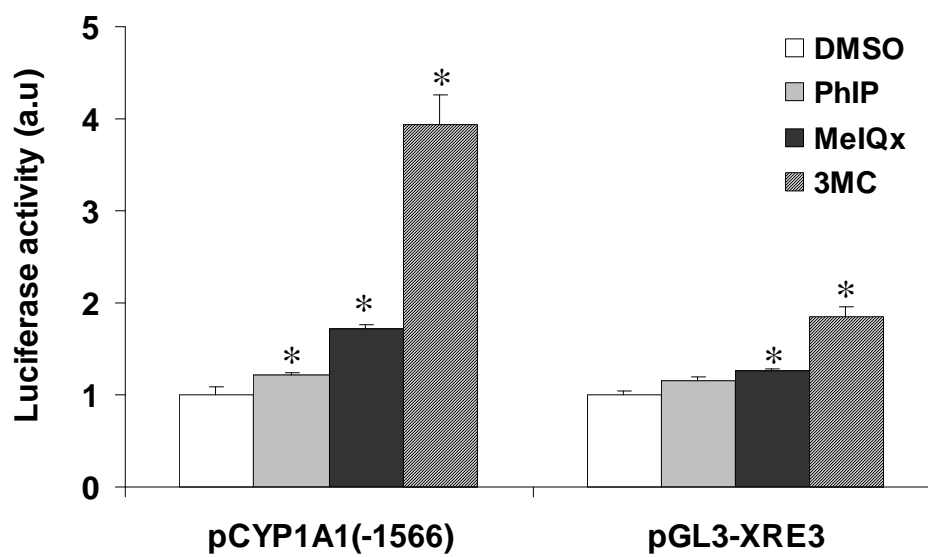
A**B**

Figure 2

**Figure 3**

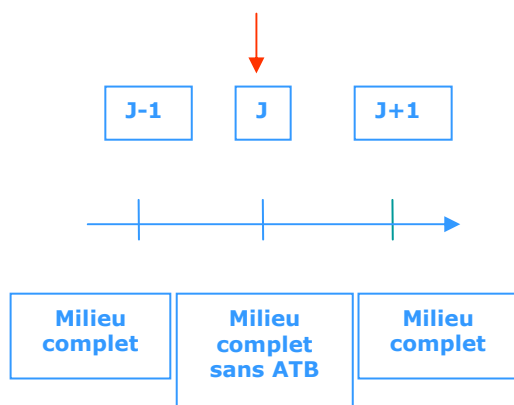
Annexe 10. Transfection des cellules HepaRG

VECTEURS D'EXPRESSION : Hepa RG proliférantes

Electroporation

0,5 µg ADN 100 000 cell./puits MW 24

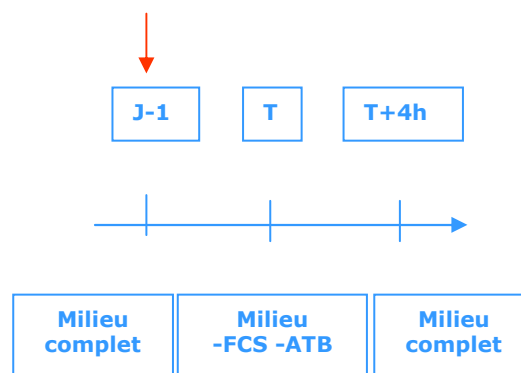
Ensemencement



Lipides : BSV-10 DOPE R1

0,5 µg ADN 100 000 cell./puits

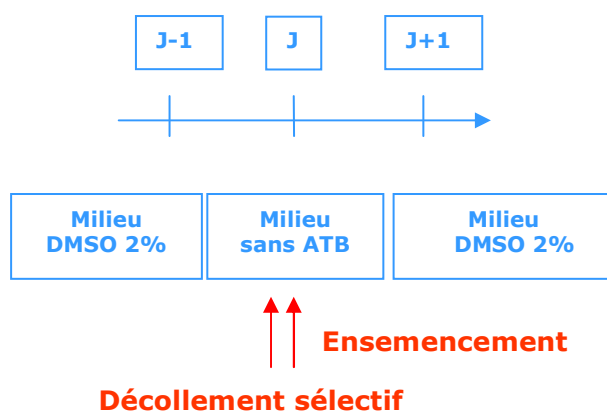
Ensemencement



VECTEURS D'EXPRESSION : Hepa RG différenciées

Electroporation

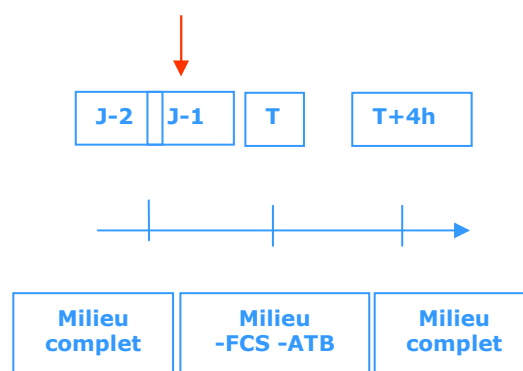
0,5 µg ADN 100 000 cell. MW 24 :
3 semaines prolifération
+ 2 à 3 semaines DMSO 2%
Condition 5 à 1700 V 20 ms 1 pulse



Lipides : Transfectin™

0,5 µg ADN 100 000 cell./puits

Ensemencement



siRNA : Hepa RG proliférantes**Electroporation**

10⁶ cellules HepaRG
100 pmoles siRNA
Electroporation à 1500 V 20 ms
puis ensemencement à la densité
de 2 × 10⁵ cellules/cm²

Lipides : siPortamine

0,25 à 0,5 10⁶ cellules
3 à 5 µl siRNA (20 µM) + 120 µl
OptiMEM
(83 nM ou 100pmoles)
10 µl siPortAmine + 120 µl OptiMEM
Mix 250 µl
1 ml de milieu William's E – SVF, ATB

siRNA : Hepa RG différenciées**Electroporation**

10⁶ cellules HepaRG
100 pmoles siRNA
Electroporation à 1500 V 20 ms
puis ensemencement à la densité
de 2 × 10⁵ cellules/cm²

Lipides : siPortamine

0,25 à 0,5 10⁶ cellules
3 à 5 µl siRNA (20 µM) + 120 µl
OptiMEM
(83 nM ou 100pmoles)
10 µl siPortAmine + 120 µl OptiMEM
Mix 250 µl
1 ml de milieu William's E – SVF, ATB

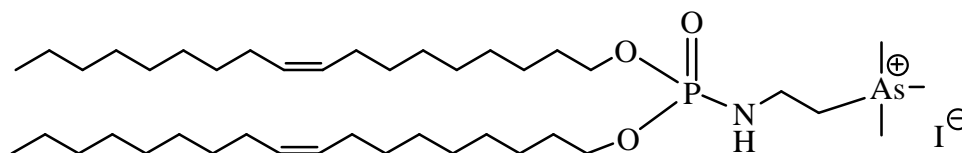
Annexe 11. Formulations des liposomes

Fiche de formulation KLN 47 (UBO)

Produit : KLN 47 (1 mg/mL)

Référence cahier de laboratoire : AF140s2

Formule : $C_{41}H_{84}AsINO_3P$



Masse molaire : 871,910 g/mol

Formulation (in vivo/ in vitro) :

→ *Film:*

Concentration: 1,15 mmol.L⁻¹ (1 mg.mL⁻¹)

Solvant d'hydratation : eau stérile

Co-lipide : oui / non
si oui composition :

Temps d'hydratation : 3 jours

Temps de sonication : 2 x 10 min

Volume fourni : 0.8 mL
(**masse de vecteur :** 0,8 mg, **volume de solvant :** 0.8 mL)

Aspect visuel : incolore limpide

→ *Mesures physico-chimiques:*

Taille : population vers 50 nm plus une population peu importante centrée à 400 nm.

Potentiel Zêta : + 63 mV

→ *Stockage et conditions d'utilisation:*

Stockage à +4°C.

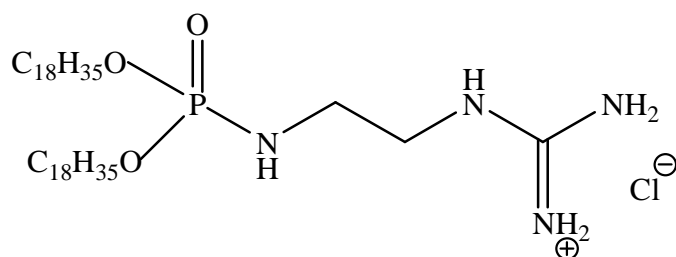
A passer 5 min aux ultra-sons avant utilisation.

Fiche de formulation BSV 10 (UBO)

Produit : BSV 10

Référence cahier de laboratoire : cahier Karine Deniel

Formule : $C_{39}H_{80}ClN_4PO_3$



Masse molaire : 719.504 g/mol

Formulation (~~in vivo~~/ in vitro) :

→ *Film:*

Concentration: 1.5 mmol.L⁻¹ (1.08 g.L⁻¹)

Solvant d'hydratation : Eau stérile

Co-lipide : oui /non

si oui composition : DOPE rapport 1/1 en nombre de mol

Temps d'hydratation : 6 jours

Temps de sonication : 15 min

Volume fourni : 0.8 mL

(**masse de vecteur :** 0.86 mg, **volume de solvant :** 0.8 mL)

Aspect visuel : solution incolore légèrement trouble

→ *Mesures physico-chimiques:*

Taille : une population entre 75 et 100 nm et une population importante en nombre < à 40 nm

Potentiel Zêta : 50 mV

→ *Stockage et conditions d'utilisation:*

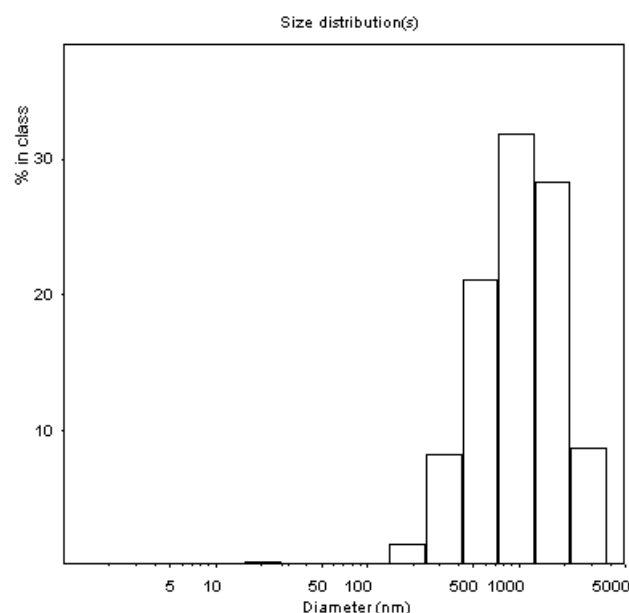
stockage à +4°C.

A passer 5 min aux ultra-sons avant utilisation.

Fiche de formulation MM18 (ENSCR)

100µl dans 2ml eau

Zaverage = 737.9 nm ; Ip = 1.0



Size(nm)	Intensity	Volume	Number	Peak Analysis by intensity			
1.3	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
2.3	0.0	0.0	0.0	1	99.6	1190.2	1996.4
4.0	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by volume			
6.9	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
11.9	0.0	3.5	24.4	1	15.8	24.3	27.6
20.7	0.2	7.5	49.4	2	84.2	2085.9	3939.1
35.8	0.1	4.4	25.6	Peak Analysis by number			
62.1	0.0	0.4	0.6	Peak	Area	Mean	Width
107.7	0.0	0.1	0.0	1	100.0	22.6	24.7
186.6	1.6	0.4	0.0				
323.4	8.2	3.5	0.0				
560.5	21.0	9.5	0.0				
971.4	31.8	14.9	0.0				
1683.7	28.2	23.0	0.0				
2918.1	8.7	23.7	0.0				
5057.6	0.0	9.3	0.0				
8765.7	0.0	0.0	0.0				
15192.5	0.0	0.0	0.0				
26331.2	0.0	0.0	0.0				
45636.7	0.0	0.0	0.0				
79096.4	0.0	0.0	0.0				
137088.2	0.0	0.0	0.0				
237598.1	0.0	0.0	0.0				
411799.6	0.0	0.0	0.0				

Fiche de formulation MM18 85% - Chol 15% (ENSCR)



Delsa™ Nano

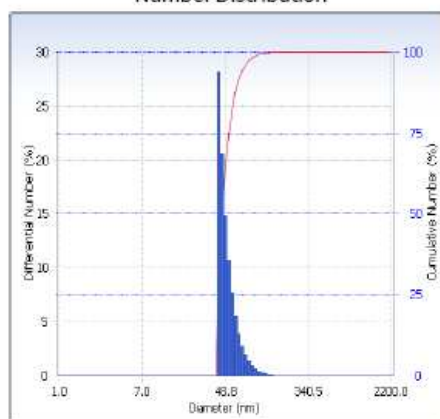
Number Distribution

Common

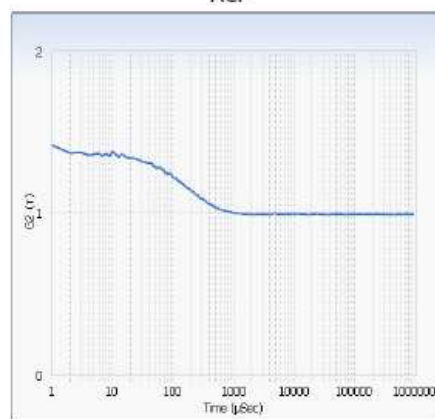
User	: Common	Group	:	Repetition	: 1/1
Date	: 3/18/2009	File Name	:	MM18Chol8515_2009031	
Time	: 09:47:34	Sample Information	:	Liposomes MM18/Chol 85/15	
SOP Name	: Size nanoparticles				

Version 1.34 / 2.00

Number Distribution



ACF



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	51.7	13.7
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	51.7	13.7
Residual	: 5.310e-003	(O.K)

Cumulants Results

Diameter (d)	: 118.6	(nm)
Polydispersity Index (P.I.)	: 0.254	
Diffusion Const. (D)	: 4.148e-008	(cm ² /sec)

Measurement Condition

Temperature	: 25.0	(°C)
Diluent Name	: WATER	
Refractive Index	: 1.3328	
Viscosity	: 0.8878	(cP)
Scattering Intensity	: 9998	(cps)



Delsa™ Nano

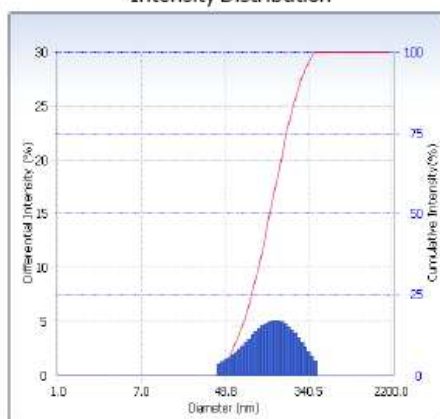
Intensity Distribution

Common

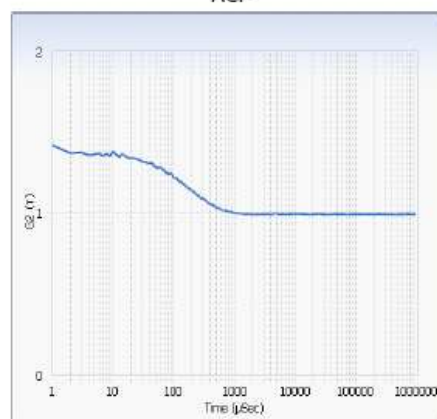
User	: Common	Group	:	Repetition	: 1/1
Date	: 3/18/2009	File Name	:	MM18Chol8515_2009031	
Time	: 09:47:34	Sample Information	:	Liposomes MM18/Chol 85/15	
SOP Name	: Size nanoparticles				

Version 1.34 / 2.00

Intensity Distribution



ACF



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	161.9	84.8
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	161.9	84.8
Residual	: 5.310e-003	(O.K)

Cumulants Results

Diameter (d) : 118.6 (nm)
 Polydispersity Index (P.I.) : 0.254
 Diffusion Const. (D) : 4.148e-008 (cm²/sec)

Measurement Condition

Temperature : 25.0 (°C)
 Diluent Name : WATER
 Refractive Index : 1.3328
 Viscosity : 0.8878 (cP)
 Scattering Intensity : 9998 (cps)



Delsa™ Nano

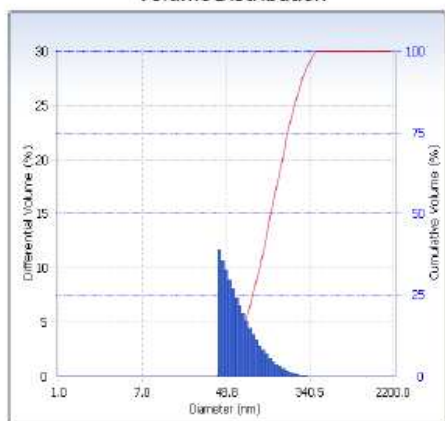
Volume Distribution

Common

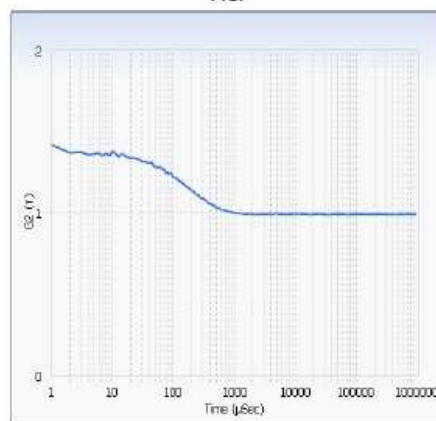
User	: Common	Group	:	Repetition	: 1/1
Date	: 3/18/2009	File Name	:	MM18Chol8515_2009031	
Time	: 09:47:34	Sample Information	:	Liposomes MM18/Chol 85/15	
SOP Name : Size nanoparticles					

Version 1.34 / 2.00

Volume Distribution



ACF



Distribution Results (Contin)

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	71.9	36.5
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Average	71.9	36.5
Residual	: 5.310e-003	(O.K)

Cumulants Results

Diameter	(d)	: 118.6	(nm)
Polydispersity Index	(P.I.)	: 0.254	
Diffusion Const.	(D)	: 4.148e-008	(cm ² /sec)
Measurement Condition			
Temperature		: 25.0	(°C)
Diluent Name		: WATER	
Refractive Index		: 1.3328	
Viscosity		: 0.8878	(cP)
Scattering Intensity		: 9998	(cps)



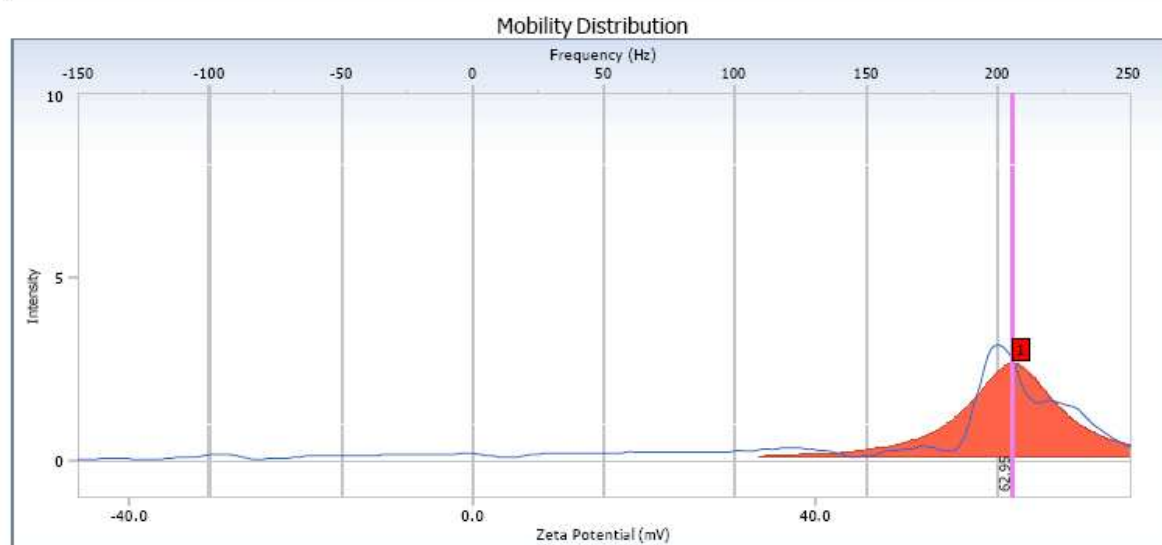
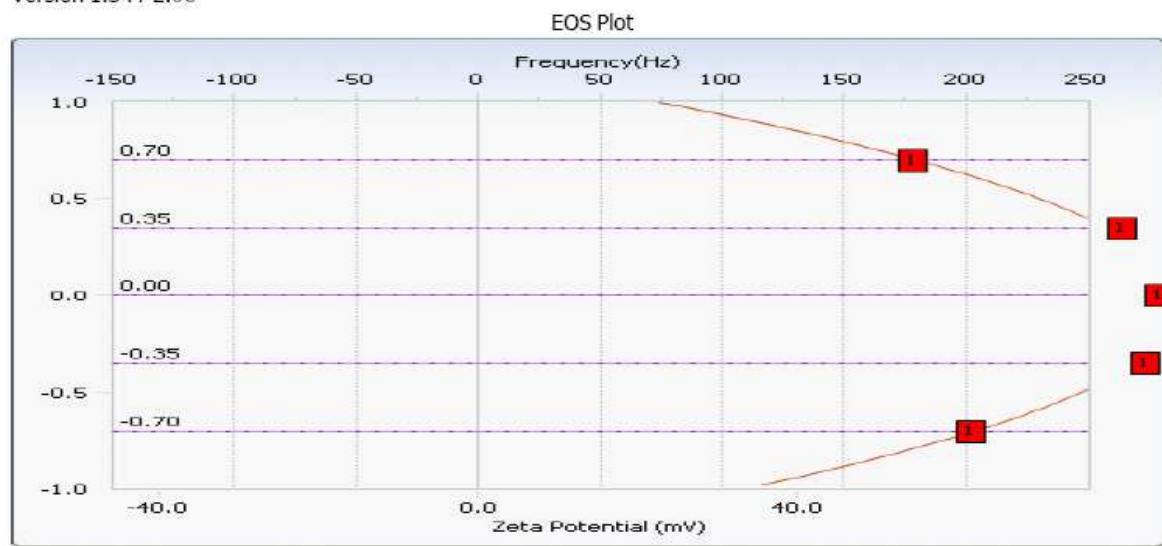
Delsa™ Nano

EOS Plot / Distribution Graph

Common

User : Common	Group :	Repetition : 1/1
Date : 3/18/2009	File Name : MM18Chol8515_2009031	
Time : 10:10:26	Sample Information : Liposomes MM18/Chol 85/15	
SOP Name : Zeta (Flow Cell)		

Version 1.34 / 2.00



Measurement Results

Zeta Potential	: 62.95	(mV)	Doppler shift	: 205.93	(Hz)
Mobility	: 4.909e-004	(cm ² /Vs)	Base Frequency	: 128.7	(Hz)
Conductivity	: 0.0329	(mS/cm)			

Zeta Potential of Cell

Upper Surface	: 40.10	(mV)
Lower Surface	: 29.77	(mV)

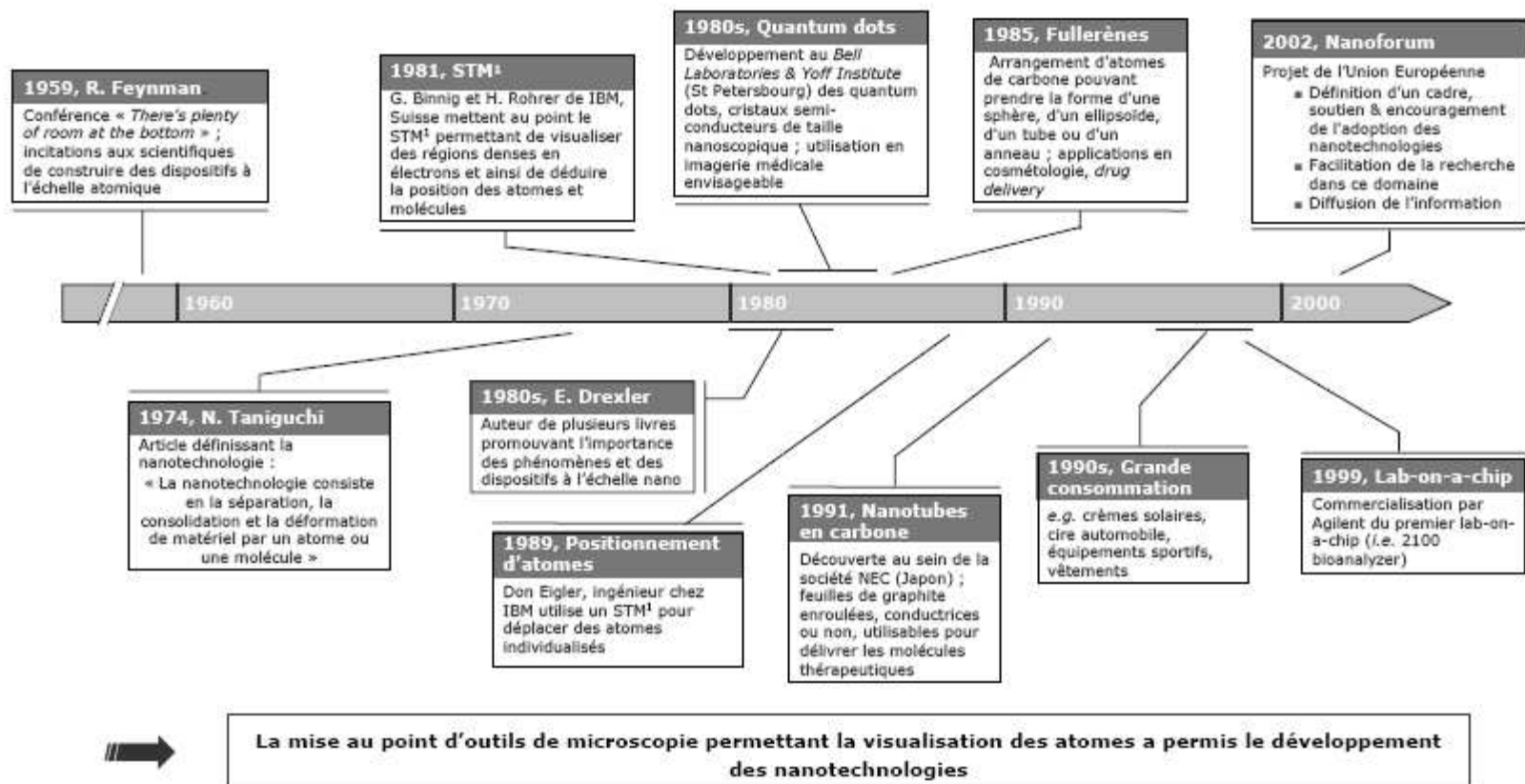
Cell Condition

Cell Type	: Flow Cell	
Avg. Electric Field	: 86.84	(V/cm)
Avg. Current	: 0.14	(mA)

Diluent Properties

Diluent Name	: WATER	
Temperature	: 25.0	(°C)
Refractive Index	: 1.3328	
Viscosity	: 0.8878	(cP)
Dielectric Constant	: 78.3	

Annexe 12. Chronologie du développement des nanotechnologies



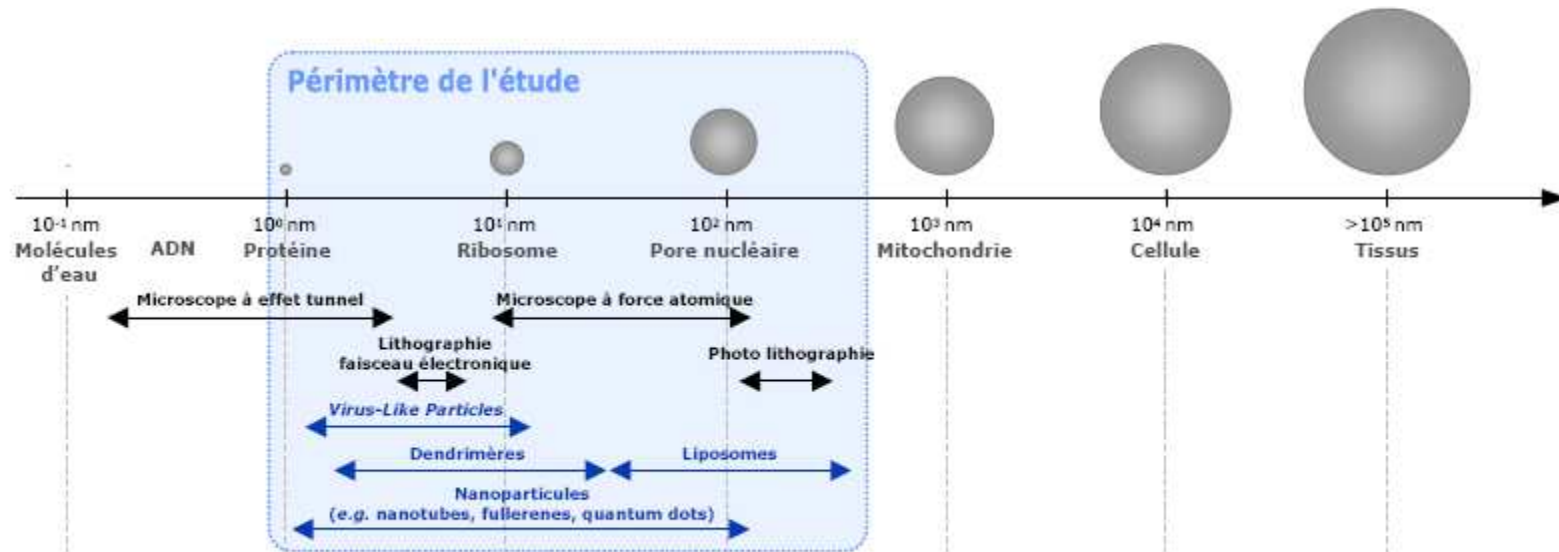
Source: nanologue.net, analyse Bionest Partners

1: STM, Scanning Tunneling Microscope

D'après Chronologie du développement des nanotechnologies. <http://www.nanologue.net>

Applications des nanotechnologies à la médecine

- Usuellement, les nanotechnologies sont définies comme la recherche et le développement de technologies à l'échelle atomique, moléculaire ou macromoléculaire conduisant à la création de **structures, dispositifs et systèmes dont la taille du composé actif est comprise entre 1 et 100 nanomètres (nm)**
- **Mais plus généralement**, les nanotechnologies concernent également des **éléments parfois de taille supérieure (ordre du micromètre) mais dont la miniaturisation leur confère de nouvelles propriétés**
 - Ainsi, les technologies de microfluidiques (i.e. microarrays) et les liposomes peuvent être considérées comme des nanotechnologies
- Lorsqu'elles s'appliquent à la médecine elles permettent d'innover dans les domaines du diagnostic, du traitement et du suivi thérapeutique



Note importante : La présente étude ne couvre pas le domaine de la médecine régénérative

Source: analyse Bionest Partners

Transdisciplinarité des applications des nanotechnologies à la médecine



■ Les applications des nanotechnologies à la médecine naissent des échanges entre les chercheurs en Biologie, Chimie, Physique et les cliniciens

- La transdisciplinarité est essentielle à l'essor de ces applications
- La capacité de ces acteurs à interagir détermine la probabilité de réussite d'un projet

■ L'échelle à laquelle ces échanges sont envisagés importe peu












- Ils peuvent être locaux, créant alors un pôle, aussi bien que nationaux ou internationaux






















Annexe 13. Prix Nobel




















Prix Nobel de Médecine



D'après <http://nobelprize.org>

1904	Ivan Petrovich Pavlov	 Russie	<i>En reconnaissance de son travail sur la physiologie digestive, grâce auquel la connaissance sur les aspects vitaux du sujet a été transformée et élargie.</i>
1910	Albrecht Kossel	 Allemagne	<i>En reconnaissance de ses contributions au savoir de la chimie cellulaire faite grâce à ses travaux sur les protéines et les acides nucléiques.</i>
1923	Frederick Banting John James Richard Macleod	 Canada	<i>Pour leur découverte de l'insuline.</i>
1934	George Hoyt Whipple George Richards Minot William Parry Murphy	 États-Unis	<i>Pour leurs découvertes concernant les thérapies hépatiques dans les cas d'anémies.</i>
1958	George Wells Beadle et Edward Lawrie Tatum Joshua Lederberg	 États-Unis  États-Unis	<i>Pour leur découverte que les gènes agissent en régulant des événements chimiques définis.</i> <i>Pour ses découvertes concernant la recombinaison génétique et l'organisation du matériel génétique des bactéries.</i>
1959	Severo Ochoa Arthur Kornberg	 Espagne  États-Unis	<i>Pour leur découverte des mécanismes de synthèse biologique des acides ribonucléiques et des acides désoxyribonucléiques.</i>
1964	Konrad Bloch Feodor Lynen	 États-Unis  RFA	<i>Pour leurs découvertes concernant le mécanisme et la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras.</i>
1965	François Jacob André Lwoff Jacques Monod	 France	<i>Pour leurs découvertes concernant le contrôle génétique des synthèse enzymatiques et virales</i>

1966	Peyton Rous	 États-Unis	Pour sa découverte des tumeurs induites par les virus .
1968	Robert Holley Har Gobind Khorana Marshall Nirenberg	 États-Unis	Pour leur interprétation du code génétique et de ses fonctions dans la synthèse protéique .
1972	Gerald M. Edelman Rodney R. Porter	 États-Unis  Royaume-Uni	Pour « leurs découvertes concernant la structure chimique des anticorps ».
1974	Albert Claude Christian de Duve George Emil Palade	 Belgique  Belgique  États-Unis	Pour « leurs découvertes concernant l'organisation structurale et fonctionnelle de la cellule ».
1975	David Baltimore Renato Dulbecco Howard Martin Temin	 États-Unis  Italie /  États-Unis  États-Unis	Pour « leurs découvertes concernant les virus cancérigènes et le matériel génétique de la cellule ».
1978	Werner Arber Daniel Nathans Hamilton O. Smith	 Suisse  États-Unis  États-Unis	Pour « la découverte des enzymes de restrictions et leur application aux problèmes de génétique moléculaire ».
1985	Michael Brown Joseph Goldstein	 États-Unis	Pour « leurs découvertes concernant la régulation du métabolisme du cholestérol ».
1986	Stanley Cohen Rita Levi-Montalcini	 États-Unis  Italie	Pour « leurs découvertes des facteurs de croissance ».
1987	Susumu Tonegawa	 Japon	Pour « sa découverte des principes génétiques à l'origine de la diversité des anticorps ».
1988	Sir James Black Gertrude Elion George Hitchings	 Royaume-Uni  États-Unis  États-Unis	Pour « leur découverte des principes importants des traitements médicamenteux ».












1989	J. Michael Bishop Harold Varmus	 États-Unis	Pour « leur découverte de l'origine cellulaire des <i>oncogènes rétroviraux</i> ».
1990	Joseph E. Murray E. Donnall Thomas	 États-Unis	Pour « leurs découvertes concernant les <i>transplantations d'organes</i> et <i>cellulaires</i> pour le traitement des maladies humaines ».
1992	Edmond Fischer Edwin G. Krebs	 Suisse /  États-Unis  États-Unis	Pour « leurs découvertes concernant les <i>phosphorylations réversibles</i> de <i>protéines</i> comme un mécanisme de régulation biologique ».
1999	Günter Blobel	 Allemagne /  États-Unis	Pour « la découverte que les <i>protéines</i> possèdent un signal intrinsèque qui gouverne leur transport et leur localisation dans la cellule ».
2001	Leland H. Hartwell R. Timothy Hunt Sir Paul M. Nurse	 États-Unis  Royaume-Uni  Royaume-Uni	Pour « leur découverte de la <i>cycline</i> et des <i>enzymes kinases</i> dépendantes de la cycline, des molécules fondamentales de la régulation du <i>cycle cellulaire</i> ».
2002	Sydney Brenner H. Robert Horvitz John E. Sulston	 Royaume-Uni  États-Unis  Royaume-Uni	Pour « leurs découvertes concernant la <i>régulation génétique</i> du <i>développement des organes</i> et la <i>mort cellulaire programmée</i> ».
2003	Paul C. Lauterbur Sir Peter Mansfield	 États-Unis  Royaume-Uni	Pour « leur découvertes concernant l' <i>imagerie par résonance magnétique</i> ».
2006	Andrew Z. Fire Craig C. Mello	 États-Unis	Pour « leurs découvertes de l'extinction de l'expression des gènes par des <i>ARN interférents double-brins</i> ».
2007	Mario Capecchi Oliver Smithies Martin Evans	 États-Unis  Royaume-Uni	Pour « leurs découvertes sur les principes d'introduction spécifique d'une modification génétique chez les souris grâce à l'utilisation de <i>cellules embryonnaires souches</i> ».
2009	Elizabeth Blackburn Carol Greider Jack Szostak	 États-Unis	Pour « leur découverte des mécanismes de protection des <i>chromosomes</i> par les <i>télomères</i> et les <i>télomérases</i> ».


















D'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_physiologie_ou_medecine

Prix Nobel de Chimie



D'après <http://nobelprize.org>

1922	Francis William Aston	 Royaume-Uni	Pour ses découvertes grâce au <i>spectromètre de masse</i> , d'un grand nombre d'isotopes non radioactifs, ainsi que pour l'énoncé de la règle des entiers pour les masses
1925	Richard Adolf Zsigmondy	 République de Weimar	Pour sa démonstration de la nature hétérogène des <i>solutions colloïdales</i> et pour les méthodes qu'il a utilisées, lesquelles sont devenues d'un intérêt fondamental dans la <i>chimie colloïdale</i> moderne
1936	Petrus Josephus Wilhelmus Debye	 Pays-Bas	Pour ses contributions à la connaissance de la <i>structure moléculaire</i> grâce à ses recherches sur les moments dipolaires et sur la <i>diffraction X</i> et électronique des gaz
1958	Frederick Sanger	 Royaume-Uni	Pour son travail sur la <i>structure des protéines</i> , spécialement celle de l' <i>insuline</i>
1963	Karl Ziegler et Giulio Natta	 RFA  Italie	Pour leurs découvertes dans le domaine de la chimie et de la technologie des <i>hauts polymères</i>
1964	Dorothy Crowfoot Hodgkin	 Royaume-Uni	Pour la détermination par les techniques des <i>rayons X</i> de la <i>structure</i> d'importantes <i>substances biologiques</i>
1969	Derek Harold Richard Barton et Odd Hassel	 Royaume-Uni  Norvège	Pour leur contribution au développement du concept de <i>conformation</i> et son application en chimie
1982	Aaron Klug	 Royaume-Uni	Pour avoir développé la <i>microscopie électronique cristallographique</i> et pour avoir déterminé la structure des <i>complexes acides-nucléiques protéines</i> biologiquement importants
1991	Richard R. Ernst	 Suisse	Pour ses contributions au développement de la <i>spectrométrie de résonance magnétique nucléaire</i> à haute résolution











1993	Kary B. Mullis ¹ , Michael Smith ²	 États-Unis  États-Unis	¹ Pour son invention de la <i>réaction en chaîne impliquant la polymérase</i> ² Pour ses contributions fondamentales à la connaissance de la <i>mutagenèse</i> et à l' <i>études des protéines</i>
2002	John B. Fenn ¹ , Koichi Tanaka ¹ et Kurt Wüthrich ²	 États-Unis  Japon  Suisse	¹ Pour leur développement des méthodes de désorption par ionisation douce pour des analyses de <i>macromolécules biologiques</i> par <i>spectrométrie de masse</i> ² Pour son développement de la <i>spectroscopie par résonance magnétique nucléaire</i> pour la détermination de la <i>structure tri-dimensionnelle</i> de <i>macromolécules biologiques en solution</i>
2004	Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose	 Israël  Israël  États-Unis	Pour leurs travaux sur la <i>dégradation des protéines</i> contrôlée par l' <i>ubiquitine</i>
2006	Roger Kornberg	 États-Unis	Pour ses travaux sur les bases moléculaires de la <i>transcription</i> chez les eucaryotes
2008	Osamu Shimomura Martin Chalfie Roger Tsien	 Japon /  États-Unis  États-Unis  États-Unis	Pour leur découverte et le développement de la <i>protéine fluorescente verte</i> , <i>GFP</i>
2009	Venkatraman Ramakrishnan Thomas Steitz Ada Yonath	 Royaume-Uni  États-Unis  États-Unis  Israël	Pour leurs études de la structure et de la fonction du <i>ribosome</i>













D'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_chimie

Prix Nobel de Physique



D'après <http://nobelprize.org>

1901	Wilhelm Conrad Röntgen	 Allemagne	En témoignage des services extraordinaires rendus par sa découverte des remarquables rayons ultérieurement nommés d'après lui.
1903	Antoine Henri Becquerel	 France	En témoignage des services extraordinaires rendus par sa découverte de la radioactivité spontanée.
	Pierre Curie	 France	En témoignage des services extraordinaires rendus par leurs recherches conjointes sur les phénomènes de radiation découverts par le Pr. Henri Becquerel.
	Marie Curie, née Sklodowska		
1907	Albert A. Michelson	 États-Unis	Pour ses instruments optiques de précision et les recherches spectroscopiques et métrologiques menées avec eux.
1908	Gabriel Lippmann	 France	Pour sa méthode de reproduction photographique des couleurs basée sur le phénomène d'interférence.
1914	Max von Laue	 Allemagne	Pour sa découverte de la diffraction des rayons X par les cristaux .
1915	Sir William Henry Bragg	 Royaume-Uni	Pour leurs contributions à l'analyse de la structure cristalline au moyen des rayons X .
	William Lawrence Bragg		
1917	Charles Glover Barkla	 Royaume-Uni	Pour sa découverte des rayonnements Röntgen caractéristiques des divers éléments.
1922	Niels Henrik David Bohr	 Danemark	Pour ses contributions à la recherche sur la structure des atomes et sur le rayonnement qu'ils émettent.
1924	Karl Manne Georg Siegbahn	 Suède	Pour ses découvertes et ses recherches dans le domaine de la spectroscopie des rayons X .

1926	Jean Baptiste Perrin	 France	Pour ses travaux sur la structure discontinue de la matière, et spécialement pour sa découverte de l'équilibre de sédimentation.
1930	Sir Chandrashekhara Venkata Râman	 Inde	Pour ses travaux sur la diffusion de la lumière et pour la découverte de l'effet nommé d'après lui.
1953	Frits (Frederik) Zernike	 Pays-Bas	Pour sa démonstration de la méthode du contraste de phase, et particulièrement pour son invention du microscope à contraste de phase.
1954	Max Born	 Royaume-Uni	Pour sa recherche fondamentale en mécanique quantique, en particulier pour son interprétation statistique de la fonction d'onde.
1981	Nicolaas Bloembergen	 États-Unis	Pour leur contribution au développement de la spectroscopie laser.
	Arthur Leonard Schawlow		
	Kai M. Siegbahn	 Suède	Pour sa contribution au développement de la spectroscopie électronique à haute résolution.
1986	Ernst Ruska	 RFA	Pour ses travaux fondamentaux en optique électronique et pour la conception du premier microscope électronique.
	Gerd Binnig	 RFA	Pour leur conception du microscope à effet tunnel à balayage.
	Heinrich Rohrer	 Suisse	
1991	Pierre-Gilles de Gennes	 France	Pour sa découverte du fait que des méthodes développées pour l'étude des phénomènes d'ordre dans des systèmes simples peuvent être généralisées à des formes plus complexes de la matière, en particulier aux cristaux liquides et aux polymères.
2005	John L. Hall	 États-Unis	Pour leurs contributions au développement de la spectroscopie laser de précision, y compris la technique du peigne de fréquence optique.
	Theodor W. Hänsch	 Allemagne	

D'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Prix_Nobel_de_physique

Annexe 14. 100 ans de progrès depuis le concept de Paul Erhlich

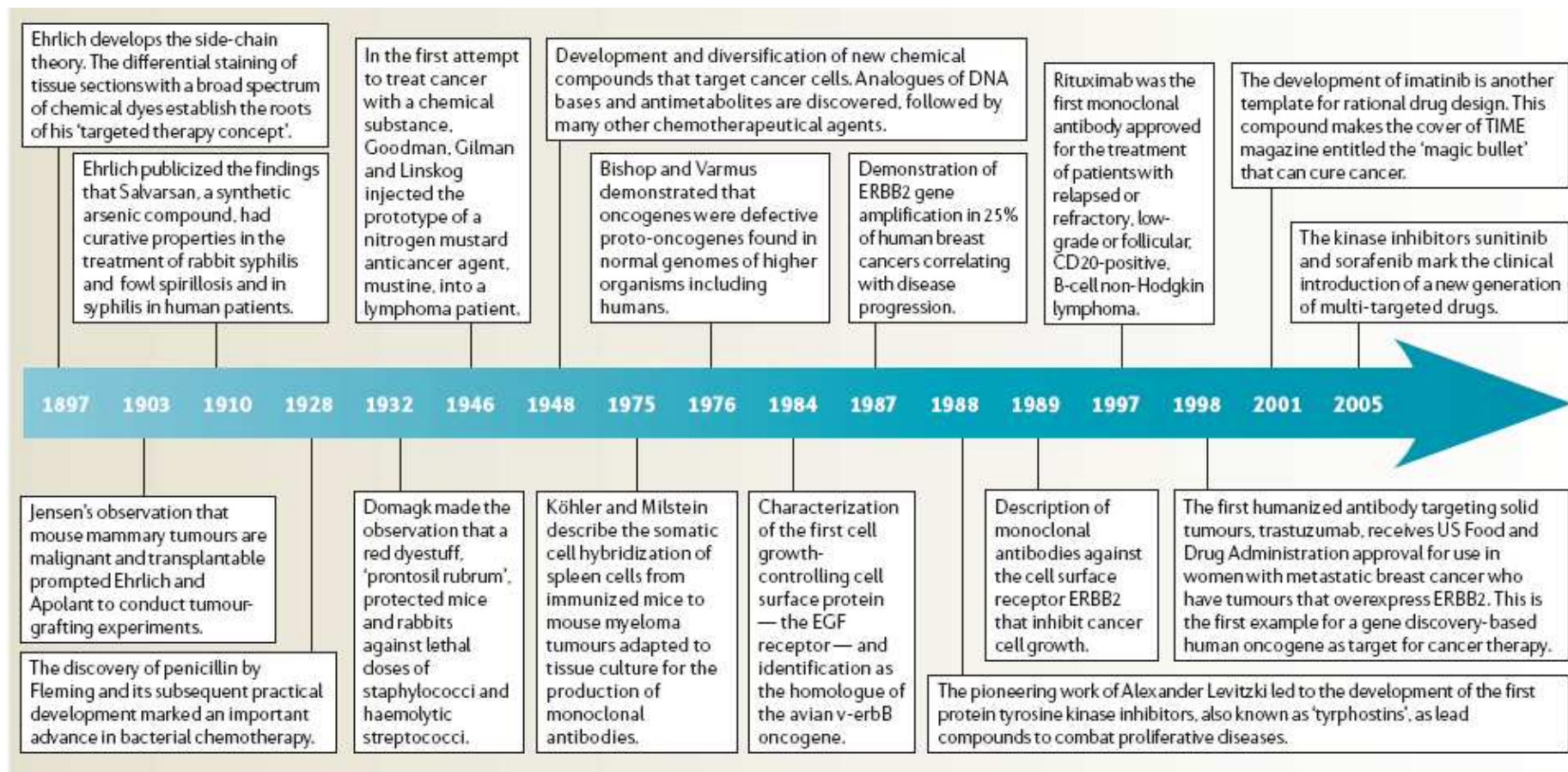


Figure. Les progrès de la thérapie du cancer depuis la théorie de Paul Ehrlich

D'après Strebhardt et Ullrich. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nature Reviews Cancer 8, 473-480 (June 2008)

VU :

Le Directeur de Thèse

Pascal LOYER

VU :

Le Responsable de l'Ecole Doctorale

Yvan LAGADEUC

VU pour autorisation de soutenance
Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(nom et prénom)